

# **Identifizierung und Charakterisierung von Plasmin(ogen)-Bindungsproteinen von *Streptococcus pneumoniae***

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation  
von

**Dipl. Biol. Simone Bergmann**  
aus Braunschweig

2002

1. Referent: Prof. Dr. K. N. Timmis

2. Referent: Prof. Dr. G. S. Chhatwal

eingereicht am: 01.08.2002

mündliche Prüfung (Disputation) am: 30.09.2002

## **Veröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen:**

Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G. S. & Hammerschmidt, S.  $\alpha$ -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Molecular Microbiology* 40(6): 1273-1287 (2001).

Bergmann, S., Frank, R., Diekmann, O., Wild, D., Bracht, D. & Hammerschmidt, S. Binding of human plasmin(ogen) to surface displayed  $\alpha$ -enolase is mediated via two binding sites in Eno of *Streptococcus pneumoniae*. Zur Veröffentlichung eingereicht.

### **Tagungsbeiträge:**

Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S. & Hammerschmidt, S.: Functional activity of pneumococcal proteins displayed on the bacterial surface. (Vortrag) Jahrestagung des Vereins für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Oldenburg (2001).

Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S. & Hammerschmidt, S.:  $\alpha$ -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. (Vortrag) 53. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Aachen (2001).

Bergmann, S., Diekmann, O., Frank, R., Chhatwal, G. S. & Hammerschmidt, S.: Interaction of the surface displayed pneumococcal  $\alpha$ -enolase with human plasmin(ogen) is mediated via a novel binding motif as revealed by biochemical analysis. (Vortrag) Sixth European Meeting on the Molecular Biology of the Pneumococcus (Europneumo), Siena, Italien (2002).

Bergmann, S., Diekmann, O., Frank, R., Chhatwal, G. S. & Hammerschmidt, S.: Surface plasmon resonance (SPR) analysis indicated the presence of a novel binding motif in the pneumococcal adhesin Eno for plasmin(ogen). (Poster) Sixth European Meeting on the Molecular Biology of the Pneumococcus (Europneumo), Siena, Italien (2002).

Bergmann, S., Diekmann, O., Frank, R., Chhatwal, G. S. & Hammerschmidt, S.: Biochemical characterization of an internal plasmin(ogen)-binding motif in the surface displayed  $\alpha$ -enolase of *Streptococcus pneumoniae*. (Vortrag) Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Göttingen (2002).

Diekmann, O., Bergmann, S. & Wehland, J.: "Moonlighting" proteins of *Listeria monocytogenes*: A novel way of invading the host? (Poster) Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Göttingen (2002).

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
2.1	Infektionskrankheiten .....	3
2.2	<i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	4
2.2.1	Infektion und klinische Aspekte .....	6
2.3	Immunabwehr .....	8
2.4	Antibiotikaresistenzen .....	9
2.5	Impfstoffe .....	10
2.6	Pathogenitätsfaktoren .....	12
2.7	Pathogenese .....	17
2.8	Zielsetzung .....	22
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>23</b>
3.1	Untersuchungen zur Bindung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> an humanes Plasmin(ogen) .....	23
3.1.1	Bindungsstudien mit unterschiedlichen Pneumokokkenisolaten .....	23
3.1.2	Charakterisierung der Plasminogenbindung durch <i>S. pneumoniae</i> ...	26
3.1.3	Biochemische Characterisierung der bakteriellen Adhäsine für Plasminogen .....	27
3.1.4	Lokalisation von Plasminogenbindungsproteinen in unterschiedlichen Zellkompartimenten von <i>S. pneumoniae</i> .....	29
3.1.5	Identifikation eines Plasmin(ogen)-Rezeptors von <i>S. pneumoniae</i> ....	31
3.2	Elektronenmikroskopische Studien zur Plasminogenbindung .....	34
3.2.1	Darstellung der Plasminogenbindung an der Oberfläche von <i>S. pneumoniae</i> .....	34
3.2.2	Subzelluläre Lokalisation des Eno-Proteins in den bakteriellen Kompartimenten .....	35
3.3	Reassoziaton von Eno an die Oberfläche von <i>S. pneumoniae</i> .....	37
3.3.1	Plasminogenbindung von Pneumokokken nach Inkubation mit Eno ..	37
3.3.2	Bindungsanalysen zur Interaktion von Eno mit <i>S. pneumoniae</i> .....	38
3.3.3	Elektronenmikroskopische Darstellung der Reassoziaton von Eno an die Oberfläche von <i>S. pneumoniae</i> .....	39

3.3.4	Elektronenmikroskopische Analyse der Plasminogenbindung nach Reassoziaton von Eno .....	41
3.4	Charakterisierung des Glykolyseenzym ENO .....	43
3.4.1	Feststellung der Kinetikparameter des Enolase-Enzyms .....	43
3.4.2	Studien zur Enolaseaktivität auf der Oberfläche von <i>S. pneumoniae</i> .....	45
3.5	Molekulare und biochemische Charakterisierung der Enolase von <i>S. pneumoniae</i> .....	46
3.5.1	Molekulare Analyse von <i>eno</i> -Gens von verschiedenen <i>S. pneumoniae</i> -Serotypen .....	46
3.5.2	Expressionsstudien zur Plasminogenbindungseigenschaft der Enolase .....	48
3.5.3	Chromatographische Bestimmung der Plasminogenaktivierung durch Eno mit dem Lysin-Substratanalogon D-Val-Leu-Lys-p-Dinitroanilid .	49
3.6	Einfluß der carboxyterminalen Lysine der Pneumokokkenproteine auf die Bindung von humanem Plasminogen .....	50
3.6.1	Plasminogenbindung nach Carboxypeptidase B-Behandlung von <i>S. pneumoniae</i> .....	51
3.6.2	Untersuchungen zur Funktion der carboxyterminalen Lysine von Eno für die Plasminogenbindung .....	52
3.6.3	Analyse der Plasminogenbindung von carboxyterminal modifizierten Eno-Proteinen unter reduzierenden Bedingungen .....	53
3.6.4	Analyse der Plasminogenbindung von carboxyterminal modifizierten Eno-Proteinen unter nativen Bedingungen .....	54
3.6.5	Plasminogenbindung von <i>S. pneumoniae</i> nach Reassoziaton von modifiziertem Eno-Protein an die bakterielle Oberfläche .....	55
3.6.6	Kinetikanalysen zur Interaktion zwischen Eno und Plasminogen unter Ausnutzung der Oberflächen- Plasmon-Resonanz-(SPR)Technik .....	57
3.6.6.1	Bestimmung der Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion von Eno mit verschiedenen Analyten .	58
3.6.6.2	Bestimmung der dynamischen Kinetikparameter nach separaten Reaktionsmodellen .....	61
3.6.7	Bindung von Plasminogen an <i>eno</i> -Mutanten von <i>S. pneumoniae</i> .....	64
3.7	Identifikation des internen Plasminogenbindungsmotivs in Eno .....	66
3.7.1	Spot-Membran Analyse der Plasminogenbindung von Eno mit	

synthetischen Peptiden .....	66
3.7.2 Identifikation des minimalen Epitops für die Plasminogenbindung im internen Bindungsmotiv von Eno .....	67
3.7.3 Computerunterstützte Analyse zur Oberflächenlokalisierung der internen Bindungssequenz im Eno-Molekül .....	68
3.7.4 Mutationsanalyse der für die Plasminogenbindung essentiellen Aminosäuren .....	69
3.7.5 Sequenzvergleich der Enolasen verschiedener Organismen .....	70
3.7.6 Kompetitive Inhibition der Plasminogenbindung mit dem synthetischen Peptid 'FYDKERKVYD' .....	72
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>75</b>
4.1 Plasminogenbindung von Mikroorganismen .....	75
4.1.1 Plasminogenbindung von <i>S. pneumoniae</i> .....	77
4.2 Glykolyseenzyme als Plasminogenrezeptoren .....	79
4.2.1 Oberflächenlokalisierung und Reassoziatio	81
4.3 Aufbau und Struktur von humanem Plasmin(ogen) .....	84
4.3.1 Plasminogen-Rezeptor-Interaktion .....	90
4.3.2 Die Funktion carboxyterminaler Lysine in der Plasminogenbindung ..	95
4.4 Interaktion des internen Bindungsmotivs mit Plasminogen .....	96
<b>5. MATERIAL und METHODEN .....</b>	<b>102</b>
5.1 Material und Chemikalien .....	102
5.1.1 Bakterienstämme .....	102
5.1.2 Kulturmedien .....	102
5.1.2.1 Nährmedien und Kulturbedingungen für <i>S. pneumoniae</i> .....	102
5.1.2.2 Nährmedien und Kulturbedingungen für <i>E. coli</i> -Stämme .....	103
5.1.3 Stammhaltung von Bakterien .....	104
5.1.4 Plasmide .....	104
5.1.5 Oligonukleotide für die PCR und für die Sequenzierung .....	104
5.1.6 Antikörper und Antiseren .....	105
5.1.7 Reagenzien .....	106
5.1.7.1 Enzyme und Nukleinsäuren für Versuche mit DNA .....	106
5.1.7.2 Restriktionsendonukleasen .....	107

5.1.7.3 Enzyme für Versuche mit Proteinen .....	107
5.1.7.4 Antibiotika .....	107
5.1.7.5 Molekularbiologische Kits .....	107
5.1.7.6 Puffer und Lösungen .....	108
5.1.8 Computerunterstützte Datenanalyse .....	109
5.2 Methoden auf DNA-Ebene .....	109
5.2.1 Agarosegelelektrophorese (Sambrook <i>et al.</i> , 1989) .....	109
5.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung .....	110
5.2.3 Phenol / Chloroform-Extraktion .....	110
5.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR, Saiki <i>et al.</i> , 1988) .....	110
5.2.5 DNA-Präparation .....	111
5.2.5.1 Präparation genomischer DNA von <i>S. pneumoniae</i> .....	111
5.2.5.2 Präparative Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> .....	111
5.2.5.3 Plasmid-Schnellpräparation aus <i>E. coli</i> (Birnboim und Doly, 1979) .....	111
5.2.6 Präzipitation von DNA .....	112
5.2.7 DNA-Extraktion aus einem präparativen Agarosegel .....	112
5.2.8 Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem QIAquick® PCR-Purification Kit .....	112
5.2.9 Methoden zur DNA-Klonierung .....	113
5.2.9.1 Enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren .....	113
5.2.9.2 Dephosphorylierung von Nukleinsäuren .....	113
5.2.9.3 Ligation von Nukleinsäuren .....	113
5.2.10 Methoden zur Transformation von Bakterien .....	113
5.2.10.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien (Böttger, 1988) .....	113
5.2.10.2 Elektroporation (Calvin und Hanawalt, 1988) .....	114
5.2.10.3 Transformation von <i>S. pneumoniae</i> (Yother <i>et al.</i> , 1986) ...	114
5.2.10.4 DNA-Sequenzierung (Sanger <i>et al.</i> , 1977) .....	114
5.2.11 Insertion-Duplikations-Mutagenese .....	115
5.2.12 "Site-directed-Mutagenesis (Ho <i>et al.</i> , 1989) .....	116
5.2.13 Methoden zum spezifischen DNA-Nachweis .....	116
5.2.13.1 Southern-Blot (Southern, 1975) .....	116
5.2.13.2 Kolonie-Hybridisierung (Grunstein und Hogness, 1975) .....	116
5.2.13.3 Digoxigenin(DIG)-Markierung von Oligonukleotiden mittels	



PCR .....	117
5.2.13.4 DNA-DNA-Hybridisierung .....	117
5.2.14 Methoden für das Arbeiten mit RNA .....	118
5.2.14.1 RNA-Präparation aus Bakterien .....	118
5.2.14.2 Elektrophoretische Auftrennung von RNA .....	118
5.3.14.3 Transfer der RNA durch Kapillarblot .....	118
5.3.14.4 Herstellung von cDNA durch reverse Transkription .....	119
5.3.14.4 PCR-Amplifikation von cDNA .....	119
5.3 Methoden zum Arbeiten mit Proteinen .....	119
5.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Lämmli <i>et al.</i> , 1970) .....	119
5.3.2 Färbemethoden .....	120
5.3.3 Western Blot und Bot Overlay Assay (Towbin <i>et al.</i> , 1979) .....	120
5.3.4 Proteindialyse .....	121
5.3.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	121
5.3.5.1 Photometrische Messung .....	121
5.3.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford (1976) .....	121
5.3.6 Dot-Spot-Analyse .....	121
5.3.7 N-terminale Sequenzanalyse .....	122
5.3.8 Analyse von Bindungskinetiken mit Hilfe der Oberflächen- Plasmon- Resonanz- (SPR) Technik .....	122
5.3.8.1 Ligandenimmobilisierung .....	122
5.3.8.2 Bindungsanalysen .....	122
5.3.8.3 Evaluierung der Bindungskinetiken .....	123
5.3.9 Proteinexpression .....	124
5.3.10 Proteinpräzipitation .....	124
5.3.10.1 Fraktionierte Fällung von Membranproteinen .....	124
5.3.10.2 Ammoniumsulfatpräzipitation .....	124
5.3.10.3 TCA-Präzipitation von Kulturüberständen .....	125
5.3.11 Methoden zur Proteinaufreinigung .....	125
5.3.11.1 Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC) .....	125
5.3.11.2 Affinitätschromatographie .....	126
5.3.12 Bindungsanalysen mit synthetischen Peptiden auf Spot Membranen (Frank, 1992 und 1995) .....	126
5.3.13 Enzymatische Methoden .....	127

5.3.13.1 $\alpha$ -Enolase-Enzym-Aktivitätstest .....	127
5.3.13.2 Plasminogen-Substrat-Assay .....	128
5.3.13.3 Enzymatische Behandlung von Pneumokokken .....	128
5.3.13.4 Carboxypeptidase B-Inkubation .....	129
5.3.14 Methoden für Versuche mit radioaktiv markierten Proteinen .....	129
5.3.14.1 Markierung von Proteinen mit $^{125}\text{I}$ od (Hunter und Greenwood, 1962) .....	129
5.3.14.2 Bindungsversuch mit $^{125}\text{I}$ -markiertem Protein .....	130
5.3.14.3 Inhibitionstudien mit radioaktiv markiertem Protein .....	130
5.3.15 Elektronenmikroskopie .....	130
5.3.15.1 "Pre-embedding labeling"-Studien .....	131
5.3.15.2 "Post-embedding labeling"-Studien .....	131
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>133</b>
<b>7. ANHANG .....</b>	<b>151</b>
A Stämme von <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	151
B Herstellernachweis der Laborgeräte .....	154
C Verbrauchsmaterial .....	156
D Chemikalien .....	156
E Firmennachweis .....	159
F Längenstandards für DNA und Proteine .....	160
G Vektorkarte von pJDC9 .....	161
H Abkürzungsverzeichnis ... ..	161
I Buchstabencode der Aminosäuren .....	163
Danksagung	

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Das humanpathogene Bakterium *Streptococcus pneumoniae* interagiert im Infektionsprozess mit verschiedenen Komponenten des Serums und der extrazellulären Matrix. So konnte gezeigt werden, dass Pneumokokken eine Plasminogenbindungsaktivität aufweisen und nach Aktivierung zu Plasmin leichter durch künstliche Basalmembranen transmigrieren (Eberhard *et al.*, 1999). In Bindungsversuchen mit radioaktiv markierten Plasminogen konnte die Bindung von Plasminogen an Pneumokokken unabhängig vom Serotyp bestätigt werden. Die aminoterminal Sequenzanalyse identifizierte ein 47 kDa Protein mit spezifischer Bindungsaktivität für Plasminogen und Plasmin. Es handelte sich bei diesem Protein um die  $\alpha$ -Enolase, genannt Eno von *Streptococcus pneumoniae*.

Eno zeigte eine 93 %ige Homologie zur  $\alpha$ -Enolase SEN (streptococcal surface enolase). SEN wurde als Plasmin(ogen)-Bindungsprotein von *S. pyogenes* beschrieben. In elektronenmikroskopischen Studien konnte das Eno-Protein sowohl im Zytoplasma als auch an der bakteriellen Oberfläche nachgewiesen werden. Ergebnisse von Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Eno-Proteinen zeigten eine konzentrationsabhängige Bindung von Eno an die Pneumokokkenoberfläche. Elektronenmikroskopische Studien bestätigten die zum ersten Mal nachgewiesene Fähigkeit von Eno auch an die Oberfläche von *S. pneumoniae* zu reassoziieren. Das *eno*-Gen umfaßt 1305 bp und konnte im Genom unterschiedlicher Pneumokokken-Serotypen hoch konserviert nachgewiesen werden. Das exprimierte Eno-Protein zeigte in jedem getesteten Serotyp eine Plasminogenbindungsaktivität.

Bindungsstudien zur Interaktion zwischen Eno mit Lysinanaloga und Plasminogenteilfragmenten zeigten, dass die Lysinbindungsstellen der Kringelmotive 1-3 an der Bindung an Eno beteiligt sind. Eno verfügt über zwei carboxyterminale Lysine, für die eine wichtige Funktion in der Interaktion mit den Lysinbindungsstellen von Plasminogen gezeigt werden konnte. Nach Proteolyse der carboxyterminalen Lysine vom Eno-Protein erfolgte eine Reduktion der Plasminogenbindung. Bindungsversuche mit mit carboxyterminal deletierten sowie substituierten Eno-Proteinen und SPR-Studien wiesen auf die Beteiligung eines weiteren Motivs in Eno an der Plasminogenbindung hin. In Spot-Membran-Analysen gelang die Identifikation eines zweiten Plasminogenbindungsmotivs im Eno-Protein. Das zweite Bindungsepitop konnte auf 9 Aminosäuren eingegrenzt und die funktionelle Bedeutung in

Inhibitionstudien mit einem das Bindungsmotiv repräsentierenden, synthetischen Peptid gezeigt werden. Dieses Motiv ist nach der Computeranalyse mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Proteinoberfläche lokalisiert.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Infektionskrankheiten

Infektionskrankheiten sind nach Studien der WHO (World Health Report, 1996) nach wie vor die am häufigsten auftretenden Erkrankungen sowohl in Entwicklungsländern als auch in Industriestaaten. Nachdem eine weitgehende Eindämmung vieler Infektionskrankheiten verzeichnet werden konnte (Neu, 1992), führten in den letzten Jahrzehnten verschiedene Umstände zu einem drastischen Anstieg der Krankheits- und Todesfälle.

Neben der weltweiten Vernetzung von Infrastrukturen und der zunehmenden Vermischung unterschiedlicher Kulturen sind vor allem die vermehrt auftretenden Antibiotikaresistenzen bei mikrobiellen Krankheitserregern für das erneute Aufkommen vieler bakterieller Infektionen verantwortlich. Die schnelle Anpassungsfähigkeit der Mikroorganismen und die hohen Kosten der Entwicklung wirksamer Antibiotika verlangen nach neuen Ansätzen und Strategien zur Krankheitsvorsorge und Heilung. Ein Ansatz ist die Gewinnung gut verträglicher Vakzine im Rahmen der Impfstoffforschung. Dazu ist es notwendig, die am Infektionsmechanismus beteiligten Komponenten zu identifizieren als auch über die natürlichen Schutzbarrieren und Immunabwehr des Menschen detaillierte Kenntnisse zu erlangen.

Die Forschung auf dem Gebiet der mikrobiellen Pathogenität beschäftigt sich mit den molekularbiologischen und biochemischen Mechanismen, die zum Ausbruch einer Krankheit durch Mikroorganismen führen können. Ein wichtiger Schwerpunkt sind die Pathogenitätsfaktoren, bei denen es sich um Faktoren handelt, die speziell im Infektionsprozess involviert sind und eine Wechselwirkung zwischen dem Bakterium und dem Wirt vermitteln. Obgleich die immer schneller fortschreitende Entwicklung in der Medizin und Biotechnologie bereits gute Erfolge in der Bekämpfung von Pneumokokken-Infektionen und im Schutz gegen Meningitiserregern verzeichnen konnte, ist das Bakterium *Streptococcus pneumoniae* zur Zeit der zweithäufigste Verursacher von bakteriellen Hirnhautentzündungen.

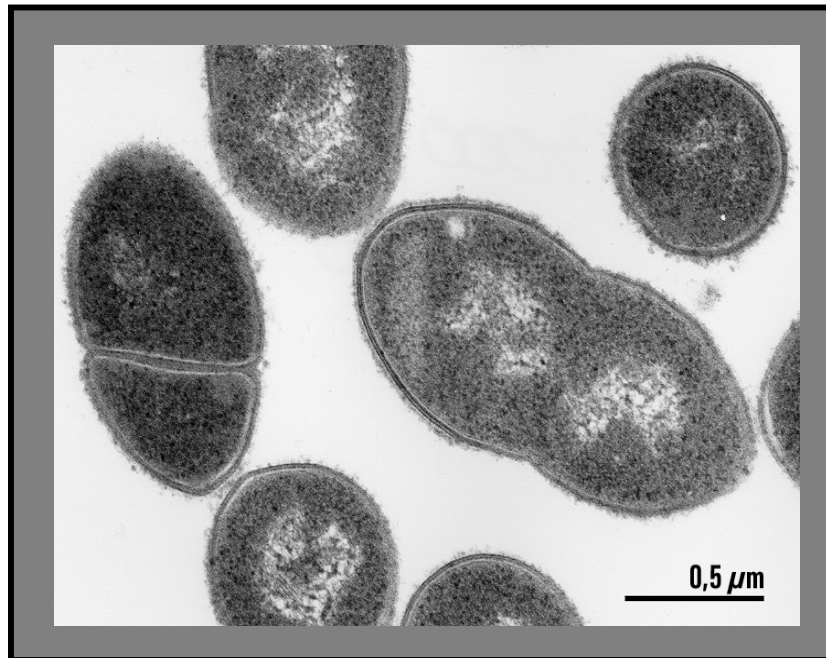
Durch die Entwicklung des *Haemophilus influenzae* Typ b-Impfstoffes wurde ein weiterer invasiver Infektionserreger eingedämmt, wodurch Streptokokken nach *Neisseria meningitidis* zum häufigsten bakteriellen Erreger bei Kleinkindern in immunisierten Bevölkerungspopulationen wurden (Dagan *et al.*, 1994). Des weiteren ist *Streptococcus pneumoniae* der Verursacher von Otitis media bei Kindern und der bedeutendste Erreger von nicht-nosokomial erworbenen Pneumonien.

## 2.2 *Streptococcus pneumoniae*

Die Familie der Streptococcaceae umfaßt unbewegliche Gram-positive Kokken, die Oxidase- und Katalase-negativ sind, keine Sporen bilden und unter fakultativ anaeroben Bedingungen wachsen (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1986). Die Streptokokken sind in der Lage, durch Fermentation von Glucose, Maltose und Sucrose unter Säurebildung Energie zu gewinnen und werden somit zu den Milchsäurebakterien gezählt (Schlegel, 1992). Die Einteilung der Streptokokken wurde aufgrund der vielen unterschiedlichen Krankheitsbilder bereits 1903 durch Schottmüller vorgenommen, der das Hämolysevermögen der Bakterien auf Blutagar als Einteilungskriterium nutzte. Die Einteilung in hämolysierende, vergrünende und nicht-hämolysierende Streptokokken wurde von Brown 1919 in Form von  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Hämolysen aufgegriffen und konkreter definiert. Eine andere Möglichkeit der taxonomischen Einteilung besteht auf der Basis von gruppenspezifischen Zellwand- bzw. Zelloberflächenantigenen, bei denen es sich entweder um polymere Kohlenhydrate oder Lipoteichonsäuren handelt (Murray *et al.*, 1990). Diese sind die Grundlage für die serologische Gruppeneinteilung nach Rebecca C. Lancefield (1928 und 1933). Entsprechend der unterschiedlichen Antigene erfolgt eine Einteilung der Bakterien von A bis V.

Im Jahre 1874 wurden durch Billroth erstmalig in Wundepreparaten die kettenförmig angeordneten Kokken als „Streptokokken“ in der Literatur verzeichnet. Die Identifizierung von *Streptococcus pneumoniae* als Erreger von Pneumonien und seine Abtrennung als besondere Art innerhalb der Gattung erfolgte durch Sternberg (1881), Pasteur (1881) und Fränkel (1884) nahezu zeitgleich. Untersuchungen zur Veränderung des Kapselphänotyps von *Streptococcus pneumoniae* führten zur Entdeckung der natürlichen Transformierbarkeit, d.h. die Fähigkeit von

Pneumokokken zur Aufnahme von DNA (Griffith, 1928). Darüberhinaus wurde durch die Entdeckung der DNA als „transformierendem Agens“ ein weiterer wichtiger Meilenstein für die molekularbiologische Forschung gesetzt (Avery, 1942).



**Abbildung 1:**

Elektronenmikroskopische Aufnahme von paarweise angeordneten *Streptococcus pneumoniae*-Bakterien.

*Streptococcus pneumoniae* unterscheidet sich von den anderen Vertretern seiner Gattung durch die Morphologie (Abb. 1). Es handelt sich um oval- bis lanzettförmige Diplokokken, die an der Basis aneinanderliegen und deren Virulenz von der Ausprägung der Kapsel abhängt. So zeigen bekapselte Stämme eine um den Faktor  $10^5$  stärkere Virulenz als unbekapselte Stämme (Watson und Musher, 1990). Die Koloniemorphologie von stark bekapselten Bakterien, die bei Kultivierung auf Blutagar schleimige,  $\alpha$ -hämolytische Kolonien mit grünem Hämolysehof ausbilden, werden als s-Form (smooth) bezeichnet, während die unbekapselten Varianten aufgrund ihrer rauhen Erscheinungsform die r-Form (rough) ausprägen. Auf Blutagarplatten bildet *S. pneumoniae* glattrandige Kolonien, die nach längerer Kultur eine charakteristische Dellenbildung in der Mitte aufweisen. Die Ursache hierfür liegt in der autolytischen Enzymaktivität, die nach Erreichen einer kritischen Bakteriendichte und verstärkt nach Anstieg der toxischen Konzentration an

Wasserstoffperoxid unter aeroben Bedingungen zu einem Absterben der Pneumokokken führt (Brandis *et al.*, 1994). Während die amerikanische Nomenklatur zur Einteilung der Pneumokokken keine biochemischen Merkmale verwendet, sondern die Isolate chronologisch nach ihren Entdeckungsdaten numeriert, erfolgt bei der zumeist verwendeten und anerkannten dänischen Taxonomie eine Unterscheidung aufgrund der Struktur der Kapselpolysaccharide. Die Serotypisierung der Pneumokokken erfolgt nach der Methode der Neufeldschen Quellungsreaktion (Neufeld, 1902), bei der eine Agglutination mit homologem Antiserum zur Einordnung verwendet wird. So konnten bislang 90 verschiedene serologische Typen aufgrund der unterschiedlichen Struktur der Kapselpolysaccharide differenziert werden (Lund und Henrichsen, 1978).

### **2.2.1 Infektion und klinische Aspekte**

Pneumokokken gehören als Kommensalen zur natürlichen Flora des oberen Respirationstraktes (Austrian, 1986) und können auch aus dem Ohr, der Lunge oder sogar aus dem Blut von gesunden Menschen ohne Krankheitssymptomen isoliert werden. Mindestens 40% der gesunden Kleinkinder (Austrian, 1986) und ein Teil der Erwachsenen sind zumindest vorübergehend asymptomatische Keimträger (Gray *et al.*, 1980). Eine hohe Prävalenz für eine Besiedlung ist besonders bei Personen in Kindertagesstätten, Krankenhäusern, Kasernen, Gefängnissen und Pflegeheimen zu beobachten (Austrian *et al.*, 1977). Eine Besiedelung durch Pneumokokken kann im Lebensverlauf wiederholt vorkommen und auch durch mehrere Serotypen gleichzeitig erfolgen. Der Bereich des Nasopharynx wird in der Regel von unterschiedlichen Kapseltypen gemeinsam kolonisiert, die sich im Grad der Virulenz unterscheiden. Dabei variiert das Auftreten bestimmter Kapseltypen und ist unter anderem abhängig von der Jahreszeit, der geographischen Region und dem Alter des Patienten (Nielsen und Henrichsen, 1992, Sankilampi *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1996).

In einigen Fällen löst der ausschließlich humanpathogene Erreger Infektionsprozesse mit Entwicklung typischer Krankheitsbilder aus. Infektionen treten dabei gehäuft bei Kindern in den ersten drei Lebensjahren auf, sowie bei Erwachsenen über 60 Jahre und bei immunsupprimierten Menschen (Gray *et al.*, 1979; Garcia-



Leonie *et al.*, 1992). *Streptococcus pneumoniae* ist weltweit der häufigste Erreger von nicht-nosokomialen Pneumonien (Lungenentzündungen), sowie nach *Neisseria meningitidis* der zweithäufigste Erreger einer bakteriellen Meningitis (Hirnhautentzündung) bei Erwachsenen (Burman *et al.*, 1985). Trotz der schnellen Entwicklung neuer antibiotischer Wirkstoffe enden 5% der Pneumokokken-Pneumonien und bis zu 30% der Pneumokokken-Meningitiden letal (Mufson, 1990). So sterben jährlich weltweit ca. eine Million von 20 Millionen an Pneumonie-erkrankte Personen und 75000 Erkrankte an den Folgen einer Pneumokokken-Meningitis (Klein, 1999).

Der Verlauf einer Pneumokokkeninfektion beginnt mit der Kolonisierung der mukosalen Zelloberflächen und Adhärenz an die Epithelzellen des oberen Respirationstraktes. In dieser ersten Phase der Anheftung sind mehrere verschiedene Rezeptoren beteiligt, die eine Bindung an eukaryotische Karbohydrate vermitteln (Tuomanen und Masure, 1997). Die Kolonisierung der mukosalen Oberflächen des Nasopharynx erfolgt dabei überwiegend durch Pneumokokken mit transparentem Phänotyp. Die Serogruppen 1, 3, 4, 7, 8, 9, 12 und 14 sind vor allem für Infektionen bei Erwachsenen verantwortlich, während bei Kindern die Serogruppen 4, 6, 9, 14, 18, 19 und 23 die meisten invasiven Pneumokokkeninfektionen hervorrufen (Butler, 1997). Eine anschließende Ausbreitung in verschiedene Bereiche des Wirtes wurde bislang nur für 20 der 90 Serotypen beschrieben. Nach einer Besiedelung der Nasenhöhle und Nasennebenhöhlen, die oftmals zu Sinusitis führt, gelangen die Pneumokokken über die Eustachische Röhre ins Mittelohr und können dort Otitis media auslösen. Etwa die Hälfte aller Mittelohrentzündungen wird durch Pneumokokken verursacht. So hat nach einer Studie in den USA fast jedes Kind unter 5 Jahren bereits eine durch Pneumokokken ausgelöste Mittelohrentzündung erlitten (Tuomanen *et al.*, 1995). Darüberhinaus kann ein Vordringen der Erreger in den bronchialen Respirationstrakt bis in die Lungenalveolen zu Lobärpneumonien führen. Unbehandelte Lokalinfectionen können darüber hinaus die Entwicklung invasiver Erkrankungen als Folge haben. So verlaufen bis zu 25 % aller Pneumokokken-Pneumonien bakteriämisch. Pneumokokken sind außerdem in der Lage, im bakteriämischen Stadium die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, in die Meningen einzudringen und diese zu infizieren. Eine Meningitis kann jedoch auch direkt (per continuitatem) ausgelöst werden. Als weitere Folgen kann es in seltenen Fällen nach Infiltration in den Blutstrom auch zur

septischen Ausbreitung in die übrigen Körperorgane kommen. Die Entwicklung von Krankheitssymptomen ist nicht allein abhängig von der Virulenz des Erregers, sondern wird entscheidend durch den Immunstatus und durch die allgemeine physiologische Konstitution des Menschen beeinflusst. So kann die Inzidenz einer Pneumokokkeninfektion durch chronische kardiovaskuläre und pulmonale Erkrankungen, chronische Leber- und Nierenerkrankungen, Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus, Erkrankungen der blutbildenden Organe, HIV-Infektion und andere Formen der Immundefizienz gefördert werden (Musher, 1992).

### 2.3 Immunabwehr

Die Immunabwehr gegen *Streptococcus pneumoniae* erfolgt hauptsächlich phagozytotisch durch neutrophile Granulozyten und Alveolarmakrophagen (Winkelstein, 1981) und mittels Aktivierung der klassischen und alternativen Komplementkaskaden (Hostetter, 1986). Das Komplement besteht aus verschiedenen Plasmaproteinen, die durch eine Aktivierungskaskade zu einer verstärkten Opsonisierung der Bakterien beitragen und so die Aktivität der Antikörper "komplementieren". Einige aktivierte Komplementproteine binden kovalent an Bakterien und opsonisieren sie für die Aufnahme durch Phagozyten über Komplementfaktorrezeptoren. Die terminalen Komplementfaktoren schädigen Mikroorganismen durch Porenbildung in den Zellmembranen (Tomlinson, 1993). Die Aktivierung der Komplementkaskaden kann durch die Antikörperbindung an Antigene auf dem "klassischen Weg" erfolgen. Dieser Weg kann durch die "alternative" Komplementaktivierung verstärkt werden, bei der eine spontan aktivierte Komplementkomponente direkt an die Oberfläche eines Pathogens bindet. Eine dritte Möglichkeit zur Komplementaktivierung ist der Lektin-vermittelte Weg. Hierbei erfolgt eine Bindung von Serumlektin an mannosehaltige Proteine oder Kohlenhydrate der Bakterien oder Viren. Bei allen drei Arten der Komplementaktivierung finden zu Beginn eine Reihe von Spaltreaktionen statt, die zur Aktivierung der C3-Konvertase führen. Die C3-Konvertase spaltet die Komplementkomponente C3. Das größere Spaltfragment (C3b) bindet über eine Thioesterbindung kovalent an die Membran und opsonisiert Bakterien, die dann von Phagozyten aufgenommen werden können. Die kleinen Spaltfragmente wirken lokal

inflammatorisch und werden als Anaphylatoxine bezeichnet, da sie eine akute systemische Entzündung auslösen. Das an die C3-Konvertase assoziierte C3b kann schließlich an C5 binden. C5 bindet an die bakterielle Zellmembran und induziert die Bildung von Membranporen. (Tomlinson, 1993). Die Komplementaktivierung bei Pneumokokkeninfektionen führt nicht zur Bakterienlyse. Pneumokokken exprimieren Proteasen, die nach Anlagerung des Komplementfaktors C3b auf der Pneumokokkenoberfläche eine Spaltung in iC3b und C3d bewirken (Winkelstein, 1981). Die Prädominanz eines der beiden Spaltungsprodukte ist serotypspezifisch und hat signifikante Auswirkungen auf die weitere Immunaktivierung. C3d ist vorherrschend bei den Serotypen 3 und 4 und wirkt aktivierend auf B-Lymphozyten, während keine Phagozytenerkennung stattfindet. Diese Serotypen sind einerseits sehr immunogen und zeigen andererseits eine hohe Phagozytoseresistenz. Im Gegensatz dazu werden die hauptsächlich Fragment iC3b prozessierenden Kapseltypen 6A und 14 sehr effizient phagozytiert (Hostetter, 1986).

## 2.4 Antibiotikaresistenzen

Die Therapie von Infektionen durch Pneumokokken wird erschwert durch das vermehrte Auftreten von Antibiotikaresistenzen besonders in Hinblick auf  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Breiman *et al.*, 1994; Leggiadro *et al.*, 1994; Duchin *et al.*, 1995). Während um 1960 noch kein Pneumokokkenisolat eine Penicillinresistenz aufwies, kam es bereits in den 70er Jahren zu Epidemien penicillinresistenter Pneumokokken (Appelbaum *et al.*, 1997). Seit einigen Jahren ist weltweit ein dramatischer Anstieg an multiplen Antibiotikaresistenzen zu beobachten. (WHO; Appelbaum, 1992, Breiman *et al.*, 1994, Gold und Moellering, 1996). Zu den wichtigsten Ursachen dieser Resistenzentwicklung zählt die unbewusste Selektion multiresistenter Stämme durch wiederholte, unkontrollierte Einnahme von Antibiotika mit breitem Wirkungsspektrum sowie die durch hohe Mobilität unterstützte rasche überregionale Ausbreitung der Erreger. So sind bereits Stämme mit Resistenzen gegen das derzeit wirkungsvollste Antibiotikum Vankomycin isoliert worden (Novak *et al.*, 1999). Aufgrund der natürlichen Transformierbarkeit der Pneumokokken wird der Austausch und eventuelle Neukombination von Resistenzgenen, die oftmals in Form von Mosaikgenclustern vorliegen, durch

horizontalen Gentransfer erleichtert. Die Kreuzvernetzung des Peptidoglycans von *Streptococcus pneumoniae* erfolgt durch Transpeptidasen zwischen Alanin-Aminosäuren (Fischer und Tomasz, 1984). Beta-Laktame binden in der aktiven Domäne der Transpeptidasen und verringern so die strukturelle Integrität der Zellwand. Die Entwicklung der Resistenz gegenüber Penicillin erfolgt durch die Expression veränderter Penicillinbindungsproteine (PBP's) mit verringerter Affinität für Penicillin und andere Beta-Laktamantibiotika (Tomasz und Munoz, 1995).

Unter Laborbedingungen wurde außerdem eine Veränderung in der Peptidoglykanquervernetzung als Reaktion auf einen Beta-Laktam-induzierten Selektionsdruck beobachtet. Dabei wurden Alanin-Alanin-Bindungen durch Alanin-Serin-Vernetzungen ersetzt (Tomasz und Munoz, 1995). Die Tetracyclin-Resistenz wird durch mobile DNA-Elemente in Form von Transposons über Artgrenzen hinaus verbreitet. Beispiele hierfür sind dTransposons Tn 916 und Tn1545 mit dem *tetM* Gen (Widdowson und Klugmann, 1999). Der genaue Mechanismus zur Tetracyclin-Resistenzentwicklung konnte noch nicht aufgeklärt werden. Während die Erythromycinresistenz in einer Ribosomenmodifikation durch Methylierung der 23rRNA begründet liegt, bewirkt der Funktionsverlust der Vancomycin-S-Histidinkinase durch Inaktivierung eines Zwei-Komponenten-Regulatorsystems eine Resistenz gegen Vancomycin (Novak *et al.*, 1999).

Die Anzahl und Diversität resistenter Pneumokokkenstämme wird in hohem Maße durch den Umgang der Gesellschaft mit Infektionserkrankungen beeinflusst. Dabei vermittelt die Entwicklung neuer Antibiotika jeweils nur einen zeitlich begrenzten Schutz, der durch die schnelle Anpassungsfähigkeit der mikrobiellen Erreger nicht dauerhaft aufrecht erhalten werden kann.

## 2.5 Impfstoffe

Als Alternative besteht die Möglichkeit der aktiven Immunisierung mit einem Pneumokokken-Vakzin (Pneumovax 23™), das die Kapselpolysaccharide der 23 häufigsten bei systemischen Infektionen vorkommenden Serotypen in Europa und den USA enthält. Antikörper gegen Kapselpolysaccharide zeigen bislang die beste Schutzwirkung in Immunisierungsstudien (Schiffman, 1983). Dieser Immunschutz ist jedoch besonders im Falle der zur Risikogruppe zählenden Kleinkinder nicht

ausreichend, da kein langfristiger Schutzeffekt erzielt werden kann (Van Dam *et al.*, 1990; Dagan *et al.*, 1996; Butler, 1997). Auch bei Erwachsenen ist die Protektion gegen invasive Infektionen mit ca. 60% relativ gering (Shapiro *et al.*, 1991). Die Vakzinforschung verfolgt daher verstärkt die Entwicklung von Konjugatimpfstoffen, bei denen eine geringe Anzahl von relevanten Kapselpolysacchariden an ein Trägerprotein gekoppelt wird. Durch das Konjugatprotein erfolgt neben der Aktivierung der T-Zell-unabhängigen Immunantwort gegen die verwendeten Polysaccharide auch eine proteinspezifische T-Zell-abhängige Immunantwort. Dies führt zur Differenzierung von Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten und zur Induktion des immunologischen Gedächtnisses und könnte somit einen längerfristigen Immunschutz bewirken. Einige der identifizierten Proteine von *Streptococcus pneumoniae* wurden als potentielle Impfstoffkandidaten in Betracht gezogen. Es handelt sich dabei um sekretierte Toxine, Enzyme, das intrazelluläre Pneumolysin, und Oberflächenproteine der Pneumokokken wie das Autolysin, PspA, PsaA und die Neuraminidase. Von diesen Kandidaten wurde nur PspA in klinischen Studien der Phase I und II weiter untersucht (Klein, 1999). Ein limitierender Faktor für die Verwendung der Konjugatimpfstoffe ist die begrenzte Anzahl der verwendeten Kapselpolysaccharide (Poland, 1999). Durch Selektion von seltenen Kapseltypen könnte der Impfschutz umgangen werden (Mbelle *et al.*, 1999; Dagan *et al.*, 1996). Vielversprechende Ergebnisse aus Studien mit Kleinkindern im Alter von 2 Monaten konnten bereits mit einem heptavalenten Konjugatimpfstoff PNCRM7 (kommerziell erhältlich unter dem Namen Prevnar<sup>®</sup>, Wyeth-Lederle-Vaccines) erzielt werden. Das Vakzin enthält Kapselpolysaccharide der Serotypen 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, die bei 70% der Pneumokokkeninfektionen bei Kindern nachgewiesen wurden und an das Diphtherie-Toxin-Homolog CRM (cross-reactive molecule 197) konjugiert waren (Rennels *et al.*, 1998). Da auf Protein basierende Vakzine einen effektiveren und längerfristigen, T-Zell-abhängigen Immunschutz bewirken und bei geeigneter Wahl eine Serotyp-unabhängige Aktivierung auslösen, wird zur Zeit verstärkt nach Vakzinkandidaten von Pneumokokken gesucht. Besonders die Virulenzfaktoren werden hinsichtlich der Immunogenität und ihrer Eignung als Vakzinbestandteil untersucht. So konnte im Tiermodell bereits nach Immunisierung mit Neuraminidase (Lock *et al.*, 1988), Autolysin (Berry *et al.*, 1989), PsaA (Talkington *et al.*, 1996), zytoplasmatischem Pneumolysin (Paton *et al.*, 1983) und PspA (McDaniel *et al.*, 1991) ein Immunschutz

gegen Pneumokokken-Infektionen erzielt werden.

## 2.6 Pathogenitätsfaktoren von *Streptococcus pneumoniae*

Bei den meisten der bislang charakterisierten Virulenzfaktoren handelt es sich um Zelloberflächenkomponenten und um einige zytosolische Proteine, die in der Adhäsion und Invasion von humanen Epithelzellen eine Rolle spielen, einen Schutz vor der humanen Immunabwehr z.B. durch Resistenz gegen Phagozytose vermitteln und entzündliche Reaktionen bewirken können.

Als ein Hauptvirulenzfaktor gelten die **Kapselpolysaccharide**, die über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft sind. Während die Zellwandpolysaccharide der Pneumokokken nach einem einheitlichen Grundmuster aufgebaut sind, unterscheiden sich die Zucker der Kapsel serotypspezifisch in ihrer chemischen Zusammensetzung. Es handelt sich in der Regel um lineare Zuckerketten aus mehreren Oligosacchariden, die zwischen zwei und acht Monosaccharide bestehen und je nach Serotyp auch Aminosucker, Phosphorylcholine, Acetyl- und Phosphatgruppen sowie Di- oder Trihexosen, Rhamnose und Galaktose enthalten (Bruyn *et al.*, 1992, Sorensen *et al.*, 1984, Van Dam, 1990). Die Kapselpolysaccharide sind insofern am Infektionsprozeß beteiligt, als sie die Pneumokokken vor Phagozytose durch polymorphkernige Lymphozyten schützen und die Aktivierung der alternativen Komplementkaskade inhibieren (Fine, 1975; Chudwin *et al.*, 1985; Bruyn *et al.*, 1992).

Die Zellwand der Pneumokokken gleicht in ihrem prinzipiellen Aufbau der anderer Gram-positiver Bakterien (Abb. 2). Ein dreischichtiges Peptidoglycangerüst aus alternierend  $\beta$ -1,4-glykosidisch verknüpften N-Acetylmureinsäuren und N-Acetylglucosaminen wird durch Aminosäuren peptidisch quervernetzt (Schlegel, 1992). Die **Komponenten der Zellwand** sind für Entzündungsprozesse im Verlauf der Pneumokokkeninfektion verantwortlich. Die Zellwand ist außerdem im Anheftungsprozess besonders von unbekapselten Pneumokokken an humane Endothelzellen beteiligt (Geelen *et al.*, 1993). Zellwandpolysaccharide Gram-positiver Bakterien fördern inflammatorische Prozesse wie die Aktivierung der Komplementkaskade und die Produktion der Anaphylotoxine C3a und C5a (Winkelstein und Tomasz, 1977 und 1978). Die Anaphylotoxine aktivieren

polymorphkernige Granulozyten am Entzündungsherd und bewirken eine Mastzellendegranulation (Johnston, 1991). Die Zellwandpolysaccharide von Pneumokokken bestehen aus **Teichonsäuren** und **Lipoteichonsäuren** und stimulieren die Produktion von Interleukin-1 bei humanen Monozyten (Riesenfeld-Orn *et al.*, 1989). Während die Teichonsäuren (C-Polysaccharide, Sorensen und Henrichsen, 1987) an N-Acetylmuraminsäure der Peptidoglykanschicht verankert sind, werden die auch als Forssman Antigen oder F-Antigen bezeichneten Lipoteichonsäuren mit Lipiden in die Zytoplasmamembran inseriert (Sorensen und Henrichsen, 1987). Ein wichtiger Bestandteil der Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren von *S. pneumoniae* ist das Phosphorylcholin (Alonso De Valesco *et al.*, 1995). Neben seiner immunogenen Eigenschaft dient es zur nicht-kovalenten Verankerung von Cholinbindungsproteinen in der Zellwand (vgl. Abb. 2; Yother *et al.*, 1986).

Das **Autolysin** ist eine 36 kDa N-Acetylmuraminsäure L-Alanin Amidase (Holtje und Tomasz, 1975), die über Cholinreste von Lipoteichonsäuren in der Zellwand verankert ist (Diaz *et al.*, 1989). Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase, bei Nährstoffmangel oder durch Antibiotikaeinwirkung kommt es zu einer Reduktion der Zellwandbiosynthese, wodurch Autolysin in aktivierter freier Form die Peptidbindung zwischen Alanin und N-Acetylmuraminsäure hydrolysiert. Die dadurch resultierende Zellaulyse der Bakterienzellen im Verlaufe der Infektion ermöglicht die Freisetzung zytosolischer und zellwandassoziierten Pathogenitätsfaktoren wie Pneumolysin und Neuraminidase (Johnson, 1977; Lock *et al.*, 1988). Des weiteren vermittelt Autolysin einen Immunschutz im Tiermodell (Berry *et al.*, 1989).

Das **PspA** (Pneumococcal surface protein A) ist ebenfalls ein Cholinbindungsprotein. Es kommt in struktureller und antigener Variation in allen klinischen Pneumokokken-Isolaten vor (Crain *et al.*, 1990) und ist zur vollständigen Virulenz der Pneumokokken notwendig (Briles *et al.*, 1988). 88 % der getesteten Pneumokokkenisolate binden über PspA spezifisch humanes Lactoferrin (Hammerschmidt *et al.*, 1999). Das monomere Glykoprotein Lactoferrin ist das wichtigste Siderophilin in mukosalen Sekretionen und den phagozytischen Zellen (Aisen und Leibmann, 1972). Darüber hinaus ist es an der Inhibition der Komplementkaskade und der Regulation der Immunantwort beteiligt (Broxmeyer *et al.*, 1978; Kievits *et al.*, 1985; Kijlstra, 1982; Mattsby-Baltzer *et al.*, 1996; Veerhuis

und Kijlstra, 1982). Pneumokokken zeigen in ersten Studien unter eisenlimitierenden Bedingungen keine Nutzung der Siderophile Lactoferrin und Transferrin als Eisenquelle. Da eine *pspA*-defiziente Mutante im systemischen Mausmodell eine verstärkte Komplementaktivierung induziert, wird für die PspA vermittelte Bindung an Lactoferrin eine Funktion in der Inhibition der Komplementaktivierung diskutiert. PspA wirkt darüber hinaus stark immunogen und vermittelt im Mausmodell einen Immunschutz gegen verschiedene Serotypen (McDaniel *et al.*, 1994). Das PspA-Protein eignet sich als Vakzinbestandteil, da die immunprotektiven Epitope des PspA im konservierten Lactoferrin-Bindungsmotiv im aminoterminalen Bereich des Proteins lokalisiert sind und eine ubiquitäre Expression des Proteins von allen Serotypen erfolgt.

Pneumokokken sind in der Lage, über **SpsA** (*Streptococcus pneumoniae* sekretorisches IgA-Bindungsprotein) sekretorisches Immunglobulin A (slgA) der humanen Körperflüssigkeiten zu binden. SpsA wird über carboxyterminal lokalisierte Cholinbindungsrepeats nicht kovalent in der Zellwand verankert und wurde als Cholinbindungsprotein A (CbpA) bezeichnet (Rosenow *et al.*, 1997). Die Bindung erfolgt dabei an die sekretorischen Komponente des slgA (Hammerschmidt *et al.*, 1997). SlgA besteht aus einem Immunglobulin A-Dimer und der sekretorischen Komponente (Tomasi *et al.*, 1965) und repräsentiert einen wichtigen Faktor der spezifischen Immunabwehr auf mukosalen Oberflächen gegen infektiöse Agenzien (Childers, 1989; Underdown und Schiff, 1986). Sowohl polymeres IgA aber auch IgM binden an den poly-Immunglobulinrezeptor (plgR) auf Epithelzellen und werden vorwiegend von der basalen Seite der mukosalen Epithelzellen auf die apikalen Oberflächen transportiert. In einem Kolonisierungsmodell der neugeborenen Ratte konnte gezeigt werden, dass die SpsA-vermittelte Anheftung von Pneumokokken an epitheliale Zellen mit der Kolonisierung des Nasopharynx korreliert. (Rosenow *et al.*, 1997). SpsA ist ein vielversprechender Impfstoffkandidat, da es unabhängig vom Serotyp in 73 % der getesteten Pneumokokken-Stämme exprimiert wird und einen hoch konservierten  $\alpha$ -helikalen Bereich aufweist (Hammerschmidt *et al.*, 1997).

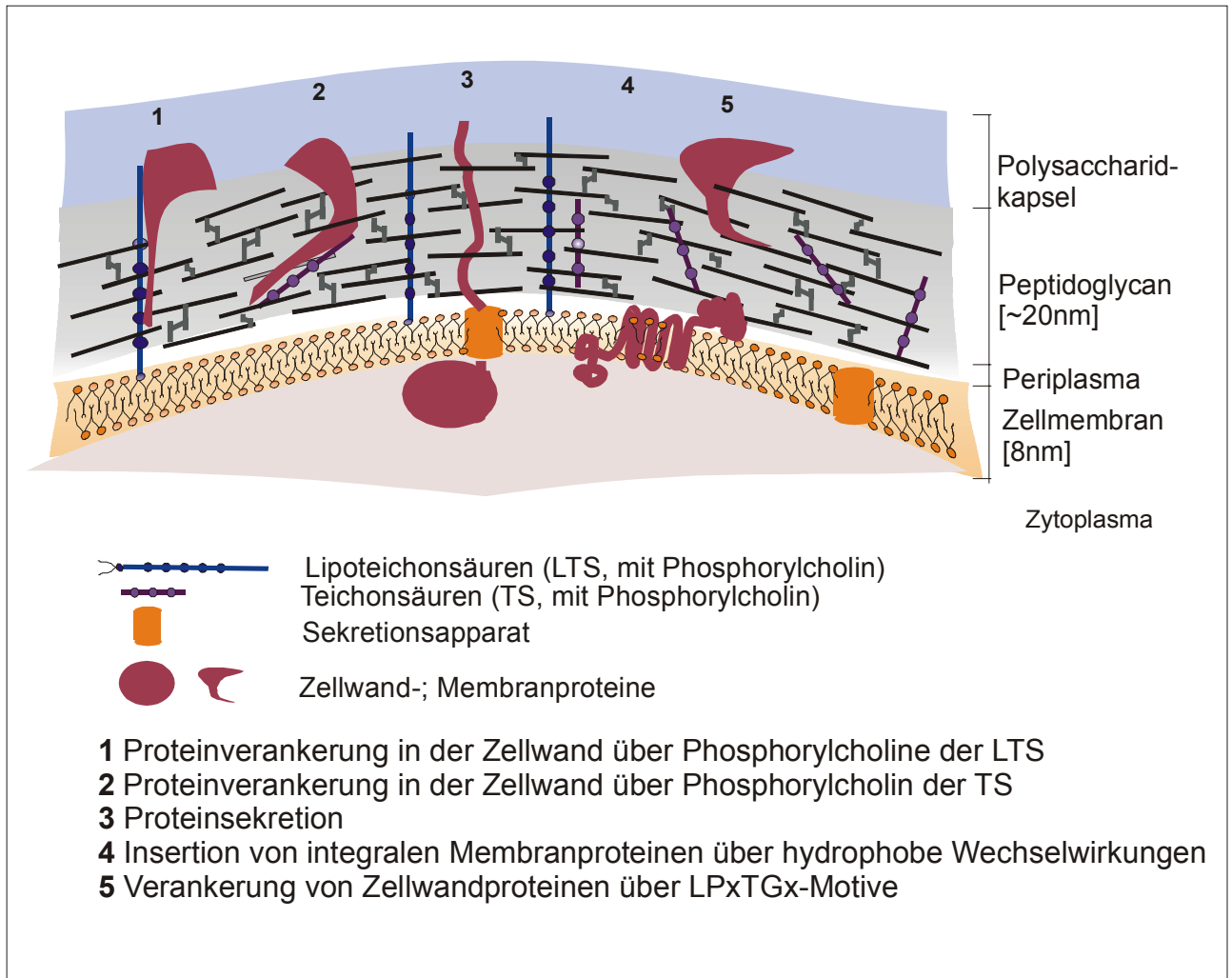
**Pneumolysin** ist ein intrazelluläres Hämolyysin, welches neben Streptolysin O (SLO), Listeriolysin, Perfringolysin und Alveolysin zu den thiol-aktivierten Toxinen gezählt wird und von allen klinischen Pneumokokkenisolaten produziert wird. Im reduzierten Milieu kann dieses Toxin verschiedene toxische Effekte hervorrufen (Boulnois, 1992). Pneumolysin bindet an das Cholesterin der eukaryotischen



Doppellipidmembran und führt in hohen Konzentrationen zur Lyse der Wirtszellen durch die Induktion von Transmembranporen. In geringeren Mengen stimuliert es die Produktion von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$  in humanen Monozyten (Houldsworth *et al.*, 1994) und hemmt den Zilienschlag der respiratorischen Epithelzellen. Weitere Eigenschaften sind die Verringerung der bakteriziden Aktivität und der Neutrophilenmigration (Paton und Ferrante, 1983), sowie die hemmende Wirkung auf Lymphozytenproliferation und Antikörpersynthese (Ferrante *et al.*, 1984). Pneumolysin bewirkt außerdem die Stimulierung des Komplementsystems über die Bindung an die Fc-Fragmente von Antikörpern (Paton *et al.*, 1993).

Das Enzym **Neuraminidase** spaltet endständige Sialinsäure von Glykolipiden und Gangliosiden. Dadurch erfolgt sowohl eine Verminderung der Viskosität von Schleim auf mukosalen Oberflächen als auch die Freilegung von Zelloberflächenrezeptoren zur erleichterten Adhäsion und Kolonisierung (Andersson *et al.*, 1983). In allen untersuchten klinischen Pneumokokkenisolaten konnten zwei Neuraminidasen, NanA und NanB nachgewiesen werden, die sich in ihrem pH-Optimum unterscheiden (Kelly *et al.*, 1967; Berry und Paton 1996). Für NanA konnte eine Verankerung in der Zellwand über das LPXTGX-Motif gezeigt werden (Cámara *et al.*, 1994). Durch Analyse des Pneumokokkengenoms wurde eine weitere Neuraminidase NanC, identifiziert (Berry and Paton, 2000). In Immunisierungsstudien im systemischen Mausmodell verleiht Neuraminidase einen Immunschutz gegen virulente Pneumokokken (Lock *et al.*, 1988).

Ein weiteres auch bei anderen Streptokokken-Spezies verbreitetes Enzym ist die **Hyaluronatlyase**, die in der Zellwand lokalisiert ist und die Depolymerisierung von Hyaluronsäure in der extrazellulären Matrix katalysiert. Das Enzym kann daher die Invasivität und Ausbreitung der Pneumokokken im Gewebeverband fördern (Humphrey, 1948 und Boulnois, 1992).



### **Abbildung 2:**

Schematische Darstellung der Zellhülle von *Streptococcus pneumoniae* und verschiedene Mechanismen zur Proteinverankerung.

Das **PsaA** (pneumococcal surface antigen A) ist ein in der Zellmembran verankertes Lipoprotein, das von allen Pneumokokkenisolaten exprimiert wird (Sampson *et al.*, 1994). Die Lipidkomponente ist an ein charakteristisches LXXC-Motiv im carboxyterminalen Bereich des PsaA kovalent gebunden und verankert das Protein in der Zellmembran (Berry und Paton, 1996). PsaA ist Teil des *psa*-Genlocus, der für eine ATP-Bindungskassette vom Typ des Manganpermeasekomplexes kodiert (Dintilhac *et al.*, 1997). Die Mutagenese des *psaA*-Gens führt zu einer Reduktion von Adhärenz (Berry und Paton, 1996), Transformationsfrequenz (Dintilhac *et al.*, 1997) und Penicillintoleranz (Novak *et al.*, 1998). PsaA stellt damit einen wichtigen Virulenzfaktor dar.

Bei weiteren bislang identifizierten Proteinen ist die Funktion als Virulenzfaktor noch nicht vollständig geklärt. Dazu gehört die **IgA1-Protease** (Male, 1979; Poulsen *et al.*, 1996), die als extrazelluläre Endopeptidase spezifisch die schwere Kette von humanem Immunglobulin A1 (IgA1) in der Hinge-Region spaltet und somit die Überwindung der mukosalen Immunabwehr erleichtert. Eine IgA1-Protease-Aktivität konnte für alle klinischen Isolate gezeigt werden (Lomholt, 1995).

Ein weiteres Oberflächenprotein von Pneumokokken ist das **PavA** Protein (pneumococcal adhesion and yirulence protein A). PavA vermittelt die Anheftung an die immobilisierte Form des Glykoproteins Fibronektin (Holmes *et al.*, 2001) und fördert so die Interaktion zwischen dem bakteriellen Erreger und der extrazellulären Matrix des Wirts. Darüber hinaus zeigten Virulenzstudien im Mausmodell, dass PavA als ein wichtiger Pathogenitätsfaktor essentiell für die Virulenz der Pneumokokken ist (Holmes *et al.*, 2001).

## 2.7 Pathogenese

Die Kolonisierung von Gewebezellen und die Ausbreitung im Wirt sind Voraussetzung für die Entstehung von bakteriellen Infektionen (Finlay und Falkow, 1997). Der derzeitige Kenntnisstand über die am Infektionsablauf beteiligten Adhäsions- und Invasionsmechanismen von Pneumokokken und der entsprechenden Rezeptoren auf humanen Zelloberflächen ist gering. Erste Einblicke konnten jedoch für die Anheftung von *Streptococcus pneumoniae* an alveoläre Zellen gewonnen werden. Die Adhäsion der Pneumokokken an Epithelzellen der Lunge und an das vaskuläre Endothelium wird durch Glykokonjugate wie N-Acetyl-D-Glukosamin  $\beta$  1-3 Galaktose (GlcNAc  $\beta$  1-3 Gal) und N-Acetyl-D-Glukosamin  $\beta$  1-4 Galaktose (GalNAc  $\beta$  1-4 Gal) der Zelloberflächen vermittelt (Cundell und Tuomanen, 1994). Eine wichtige Rolle im Invasionsprozess spielt dabei der auf Wirtsoberflächen exprimierte Rezeptor für den Thrombozyten-aktivierte Faktor ("platelet activating factor") genannt PAF-Rezeptor (Cundell *et al.*, 1995). Aus den Ergebnissen von Inhibitionsstudien mit PAF-Antagonisten und verschiedenen Zuckern wie Lacto-N-Neotetraose und N-Acetylglucosamin wird geschlossen, dass zwei Bindungsdomänen im PAF-Rezeptor

die Bindung der Pneumokokken vermitteln. Dabei erfolgt eine Bindung an die PAF-Bindungsdomäne des Rezeptors, während die zweite Interaktion über das Kohlenhydrat einer glykosylierten Rezeptordomäne erfolgt (Cundell *et al.*, 1995). Die Bindung von PAF an den PAF-Rezeptor induziert eine G-Protein gekoppelte Signalkaskade, die mit einer Internalisation des Rezeptorkomplexes einhergeht. Obgleich nach Interaktion mit Pneumokokken keine G-Protein-abhängige Aktivierung der Signaltransduktion zu beobachten ist, wird angenommen, dass der Rezeptor die Internalisation der Pneumokokken erleichtert (Cundell *et al.*, 1995). Die verschiedenen adhäsiven und invasiven Fähigkeiten der Pneumokokken stehen in Zusammenhang mit der unterschiedlichen Kolonimorphologie der Bakterien. Die Veränderung der Kolonimorphologie liegt in einer spontanen und reversiblen Phasenvariation begründet, die mit einer Frequenz von  $10^{-3}$  bis  $10^{-6}$  erfolgt (Weiser *et al.*, 1994). Während der transparente Phänotyp eine hohe Kolonisierungsrate auf Nasenepithelien von neugeborenen Ratten aufweist, zeigt der opaque Phänotyp im systemischen in vivo-Modell eine stärkere Virulenz (Kim und Weiser 1998). Die Abhängigkeit der Virulenz vom Phänotyp äußert sich darüber hinaus in der unterschiedlichen Expression von Virulenzfaktoren. Opaque Varianten weisen einen höheren Gehalt an Kapselpolysacchariden auf, exprimieren jedoch eine geringere Menge an Teichonsäuren und damit auch an Phosphorylcholin (Kim und Weiser, 1998). Phosphorylcholin ist eine wichtige Zellwandkomponente im Autolysin-vermittelten Zellteilungsmechanismus und stellt außerdem einen Verankerungspunkt für cholinbindende Oberflächenproteine von Pneumokokken dar, so dass eine verringerte Oberflächenpräsenz von bestimmten Virulenzfaktoren die Folge ist. Dagegen exprimieren transparente Varianten mehr LytA (Autolysin) und SpsA, während die Expression von PspA verstärkt in opaquen Varianten erfolgt (Rosenow *et al.*, 1997; Weiser *et al.*, 1994).

Neben der direkten Anheftung an epitheliale Zellen findet bei einigen Bakterien eine spezifische Interaktion mit Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) statt. Die extrazelluläre Matrix besteht aus fibrillären und netzwerkbildenden Kollagenen. Während die Kollagentypen I, II und III als Faserbündel aus mehreren Kollagenfibrillen das Gerüst der extrazellulären Matrix aufbauen, besteht die Basalmembran vorwiegend aus dem nicht-fibrillären Kollagentyp IV. Die Basalmembran ist eine spezialisierte extrazelluläre Matrix, die an der basalen Seite epithelialer Zellen ausgebildet wird. Neben dem Kollagen besteht die

Basalmembran vor allem aus Proteoglykanen, Fibronectin, dem hochmolekularen Laminin (900 kDa, Hay, 1991) sowie Entaktin, einem 150 kDa Glykoprotein (Carlin *et al.*, 1981). Die Verankerung der Zelle auf der Basalmembran erfolgt über Integrine, die als Hemidesmosomen oder als fokale Adhäsionskontakte organisiert sind. Während in Hemidesmosomen  $\alpha_6\beta_4$ -Integrine mit Intermediärfilamenten verbunden sind, treten Integrine in Fokalkontakten über Talin und Vinculin mit Aktinfilamenten in Kontakt. Das Kollagennetzwerk der extrazellulären Matrix durchspannt eine Gelmatrix, die aus unverzweigten Polysacchariden, den Glykosaminoglykanen gebildet wird (Alberts *et al.*, 1994). Die Polysaccharide bestehen aus sich wiederholenden Disacchariden, die aus jeweils einem Aminosucker (N-Acetylglukosamin oder N-Acetylgalaktosamin) bestehen. Glykosaminoglykane werden aufgrund der Zuckerzusammensetzung und der Sulfatgruppe in die fünf Gruppen Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat und Heparin unterteilt (Jackson *et al.*, 1991). Während die Kollagenfibrillen starken Zugkräften widerstehen, bilden die negativ geladenen stark hydrophilen Zucker als quellungsfähige Matrix einen Schutz gegen komprimierende Kräfte. Das Protein Elastin verleiht der extrazellulären Matrix darüber hinaus Elastizität. Mit Ausnahme der Hyaluronsäure liegen die Glykosaminoglykane an Proteine assoziiert in Form von Proteoglykanen vor. Neben der Schutzfunktionen und der Formgebung ist die extrazelluläre Matrix maßgeblich an Zelldifferenzierung und an Zellmigrationsprozesse beteiligt. Die extrazelluläre Matrix enthält darüber hinaus ein Vielzahl von Proteinen, die durch ihre adhäsiven Eigenschaften eine Interaktion zwischen Zelloberflächen und anderen Matrixkomponenten vermitteln. Dazu gehören das dimere Glykoprotein Fibronectin des Bindegewebes sowie das in der Basalmembran vorkommende Laminin. Einige dieser Proteine stellen Kontaktmoleküle dar, mit denen pathogene Mikroorganismen im Infektionsverlauf interagieren. Neben dem Fibronectin zählen auch Vitronectin, sowie Fibrinogen und Thrombospondin (Preissner und Chhatwal, 1999) dazu. Bakterielle Liganden, die an Bestandteile der extrazellulären Matrix oder des Plasmas binden, werden als MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) bezeichnet (Patti *et al.*, 1994). Sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien nutzen die Interaktion mit Komponenten der ECM für die Adhärenz und Invasion (Chhatwal und Preissner, 2000; Duensing und Putten, 1997). Für Fibronectin konnte eine Interaktion mit Liganden aus verschiedenen

bakteriellen Spezies gezeigt werden, wie *Staphylococcus aureus* und Streptokokkus-Arten (Hanski und Caparon, 1992; Joh, 1994, Mosher und Procter, 1980; Patti *et al.*, 1994; Talay *et al.*, 1991 und 1992). Die Fibronektinbindung vermittelt dabei die Adhärenz an Epithelzellen und trägt bei *Streptococcus pyogenes* zur Internalisation der Erreger bei (Talay *et al.*, 2000). Die Invasion von Bakterien in tiefere Gewebsschichten wird durch die Degradation der extrazellulären Matrix begünstigt. Die proteolytische Degradation erfolgt durch Kollagenasen und Elastasen und durch Plasmin. Bei Plasmin handelt es sich um eine Serinprotease, die einen Hauptfaktor der Fibrinolyse darstellt. Aktives Plasmin hydrolysiert verschiedene Matrixkomponenten wie Vitronectin und Laminin und aktiviert darüber hinaus weitere Proteasen wie Kollagenasen. Die Induktion der proteolytischen Gewebedegradation durch Aktivierung des Plasminogens auf Zelloberflächen hat signifikante Auswirkungen auf Wundheilungsprozesse, Gewebserneuerungsprozesse, Embryogenese und der Ausbreitung und Metastasierung von Tumorzellen (Plow *et al.*, 1995). Das enzymatisch aktive Dimer Plasmin entsteht durch Proteolyse des Zymogens Plasminogen. Die Proteolyse erfolgt durch die physiologische Plasminogenaktivatoren wie die in Harnwegsepithelien gebildeten Urokinase (u-PA, Urokinasetyp-Plasminogenaktivator) und t-PA (Gewebetyp-Plasminogenaktivator), der besonders bei Entzündungsreaktionen aus Gefäßendothelien freigesetzt wird (Preissner und Chhatwal, 1999). Eine spezifische Bindung an Plasminogen konnte sowohl für Gram-positive als auch für Gram-negative Mikroorganismen gezeigt werden (Tab. 5). Dazu zählen *Staphylococcus aureus*, Gruppe A, C und G-Streptokokken, sowie *Salmonella enterica*, Meningitis-assoziierte *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* und *Neisseria meningitidis* aber auch *Borellia burgdorferi* sowie *Yersinia pestis* (Kuusela und Saksela, 1990; Kuusela *et al.*, 1992; Parkkinen *et al.*, 1991; Parkkinen und Korhonen, 1989; Sjöbring *et al.*, 1994; Ullberg *et al.*, 1990, 1989 und 1992; Hu *et al.*, 1997 und 1998; Fuchs *et al.*, 1994). Einige der identifizierten prokaryotischen Plasminogenrezeptoren wurden bereits näher charakterisiert (Tab. 5). Dazu zählen z.B. die Streptokinase von *Streptococcus pyogenes* (Matsuo *et al.*, 1990) und die Staphylokinase von *Staphylococcus aureus* (Tewodros *et al.*, 1995), die als sekretierte Plasminogenbindungsproteine Plasminogen binden und in aktives Plasmin konvertieren können. Aber auch das M-like Protein genannt PAM von pyogenen Streptokokken und Fimbrienstrukturen sowohl von *Escherichia coli* als

auch von Salmonellen weisen spezifische Bindungseigenschaften an Plasminogen auf (Parkkinen und Korhonen, 1989). Darüber hinaus vermittelt die Bindung des Plasminogens an bakterielle Liganden einen Schutz gegenüber den Inhibitoren des Wirtes und fördert die invasive Ausbreitung im Gewebe (Fuchs *et al.*, 1994; Parkkinen und Korhonen 1989; Perides *et al.*, 1996). Die Auswirkungen und Funktion der Plasminogenbindung durch hauptsächlich pathogene Mikroorganismen ist daher seit einiger Zeit Gegenstand der Pathogenitätsforschung. Bereits 1933 wurden Studien veröffentlicht, in denen die Fähigkeit von Gram-positiven Bakterien, die fibrinolytische Aktivität des humanen Plasmin(ogen)s zu ihrem eigenen Vorteil im Rahmen der Gewebekolonisierung zu nutzen, diskutiert wird. (Tillet und Garner, 1933). Ein erster Hinweis war die Beobachtung, dass an Zelloberflächen-gebundenes, aktiviertes Plasmin eine erhöhte proteolytische Aktivität aufweist. Dies wurde u.a. für Plasminsubstrate der extrazellulären Matrix wie Fibronektin, Laminin, und Vitronektin (Duval-Jobe und Parmely, 1994; Gonzales-Gronow *et al.*, 1991) aber auch für die plasminabhängige Aktivierung matrixdegradierender Proteasen wie Kollagenasen (Wong *et al.*, 1992) beschrieben. 1996 konnte erstmals gezeigt werden, dass der prokaryotische 48 kDa Plasminogenrezeptor Streptokinase den Invasionsprozess der pyogenen Streptokokken durch das Gewebe fördert (Christensen *et al.*, 1996). Des weiteren wurde für den Plasminogenaktivator Pla von *Yersinia pestis* eine essentielle Funktion im Invasionsprozess der Pesterreger in humane Epithelzellen nachgewiesen (Lahteenmaki *et al.*, 2001). In ersten Studien zur Plasminogenbindung wurde bereits 1989 beobachtet, dass *Streptococcus pneumoniae* neben fünf weiteren  $\alpha$ -hämolytischen Stämmen spezifisch humanes Plasminogen bindet (Ullberg *et al.*, 1989). Ergebnisse von Transmigrationsversuchen mit Pneumokokken unter Verwendung von künstlichen Basalmembranen führten 10 Jahre später zur Annahme, dass auch dieser humanpathogene Erreger die proteolytischen Aktivität des Plasmins zur erleichterten Gewebeeinfiltration und damit einhergehender Kolonisierung nutzt (Eberhard *et al.*, 1999). Bislang ist jedoch unklar, welche Rezeptoren die Interaktion zwischen den Pneumokokken und Plasminogen vermitteln.

## 2.8 Zielsetzung

In vorhergehenden Studien wurde gezeigt, dass *Streptococcus pneumoniae* humanes Plasminogen bindet. In Versuchen mit künstlichen Basalmembranen zeigten Pneumokokken die Nutzung der proteolytischen Aktivität des Plasmins, welches die aktivierte Form des Plasminogens darstellt, zur erleichterten Migration durch Gewebeschichten (Eberhard *et al.*, 1999). Bislang waren die Rezeptoren von *S. pneumoniae* für Plasminogen jedoch unbekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Plasminogenrezeptoren der Pneumokokken zu identifizieren und auf molekularbiologischer und biochemischer Ebene zu charakterisieren. Zur Identifizierung sollten die Proteinkomponenten der einzelnen bakteriellen Zellkompartimente auf Plasminogenbindung untersucht und die Bindungsproteine identifiziert werden. Die codierenden Gene für die identifizierten Proteine sollten in Expressionsvektoren kloniert und die rekombinanten Proteine aufgereinigt werden. Zur Untersuchung der Rezeptor-Plasminogen-Interaktion sollten biochemische Analysen durchgeführt werden. Im Mittelpunkt sollte dabei die Analyse der Bindungsmotive stehen. Untersuchungen zur Lokalisation des Rezeptors und der Plasminogenbindung auf der bakteriellen Oberfläche stellten ebenfalls einen wichtigen Aspekt der Arbeit dar.



## 3 ERGEBNISSE

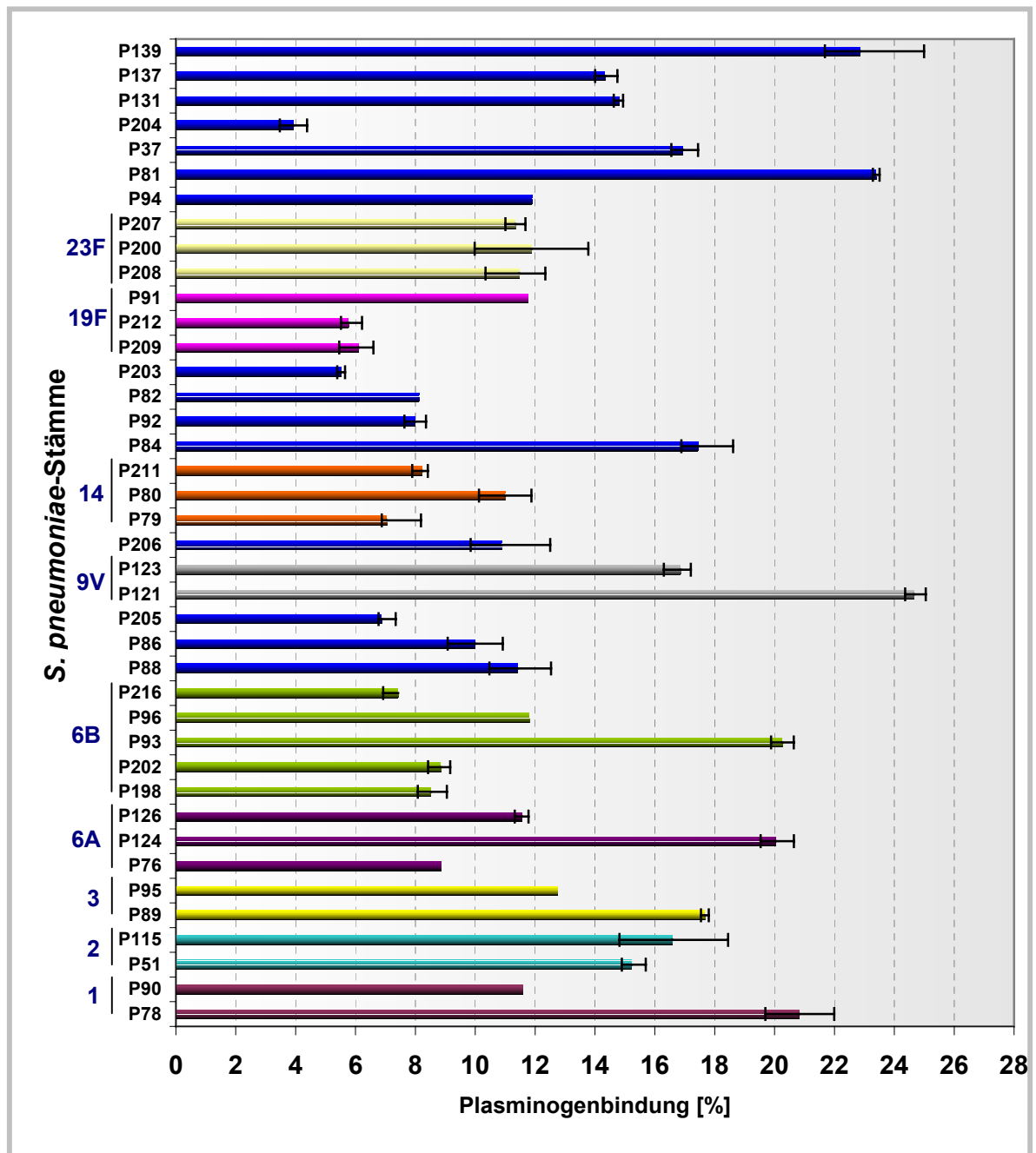
### 3.1 Untersuchungen zur Bindung von *Streptococcus pneumoniae* an humanes Plasmin(ogen)

#### 3.1.1 Bindungsstudien mit unterschiedlichen Pneumokokkenisolaten

*Streptococcus pneumoniae* verursacht unterschiedliche lokale Infektionen und kann invasive systemische Erkrankungen hervorrufen. Der Erreger ist in der Lage im Gewebe zu kolonisieren und invasiv sowohl ins Epithel- und Endothelzellen aber auch in tiefere interzelluläre Gewebsschichten vorzudringen. Pneumokokken exprimieren verschiedene Virulenzfaktoren auf der bakteriellen Oberfläche, die mit verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) interagieren.

Für verschiedene Gram-positive Bakterien einschließlich der Gattung *Streptococcus* sind spezifische Wechselwirkungen mit den Serumkomponenten Plasminogen und Plasmin nachgewiesen worden (Pancholi und Fischetti, 1997; Berge und Sjöbring, 1993; Lottenberg *et al.*, 1992; Christensen, 1945; Ben Nasr *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1999; Rosey *et al.*, 1999; Ward und Leigh, 2002; Sako und Tsuchida, 1983). Pneumokokken zeigten in Matrigelversuchen nach Bindung von humanem Plasminogen durch die proteolytischen Aktivität des Plasmins eine erleichterte Migration durch das Gewebe (Eberhard *et al.*, 1999).

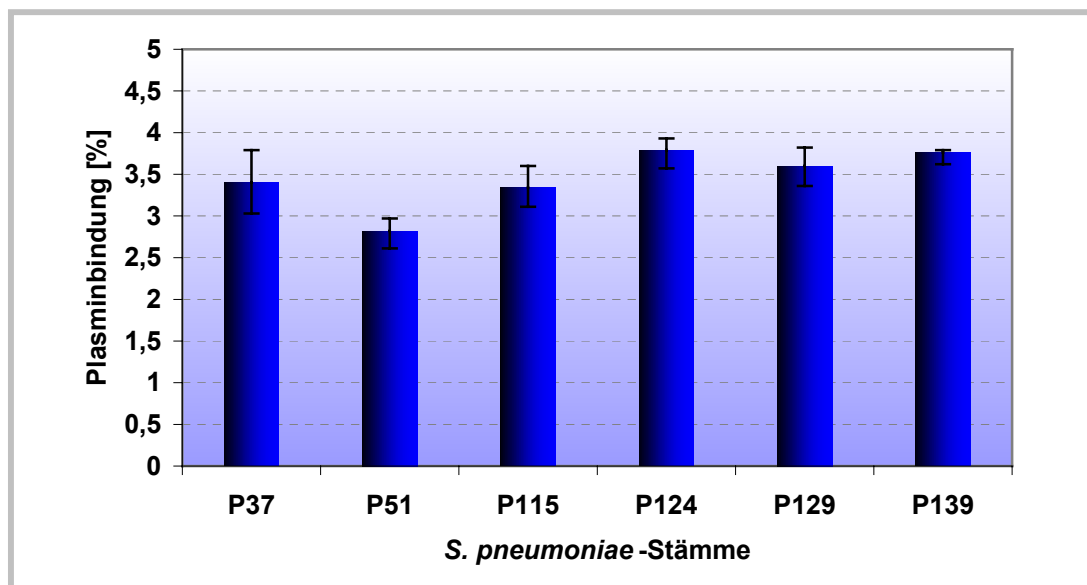
Zur Identifikation der bakteriellen Adhäsine erfolgten Plasminogenbindungsversuche mit verschiedenen Serotypen. Die Bindung von humanem Plasminogen und Plasmin an 22 unterschiedliche *S. pneumoniae* Serotypen wurde in Bindungsversuchen mit radioaktiv markiertem Protein untersucht. Es handelte sich hierbei sowohl um definierte Stämme aus den Stammsammlungen ATCC und NCTC, um klinische Isolate, als auch opaque und transparente Varianten von klinischen Isolaten. Zur Kontrolle des radioaktiv markierten Proteins wurden jeweils unmittelbar vor Durchführung des eigentlichen Bindungsversuches mit Pneumokokkenisolaten die Bindung an den *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  und an die *Streptococcus pyogenes* Stämme A11 und A158 durchgeführt. Sowohl der *E. coli*-Stamm, als auch der A11 zeigten in mehreren unabhängigen Plasminogenbindungsversuchen eine Bindung von maximal 5 %, während der A158 reproduzierbar eine Bindungsaktivität von über 95 % an intaktes Plasminogen aufwies.



**Abbildung 3:**

Bindung von  $^{125}$ I-Plasminogen an verschiedene Serotypen von *Streptococcus pneumoniae*.  
 1, 2: Serotyp 1; 3, 4: Serotyp 2; 5, 6: Serotyp 3; 7-9: Serotyp 6A; 10-14: Serotyp 6B; 15: Serotyp 7F; 16: Serotyp 8; 17: Serotyp 9N; 18, 19: Serotyp 9V, 20: Serotyp 10A, 21- 23: Serotyp 14; 24: Serotyp 14A, 25: Serotyp 18B, 26: Serotyp 18F, 27: Serotyp 19A, 28-30: Serotyp 19F, 31-33: Serotyp 23F, 34: Serotyp 24F, 35: Serotyp 33F, 36: Serotyp 35A, 37: Serotyp 35B, 38: Nasopharynxisolat, 39: Augenisolat, 40: R6x. Die Standardabweichung wurde jeweils von mindestens drei unabhängigen Meßwerten ermittelt.

Die Ergebnisse der Bindungsversuche zeigten, dass ca. 91 % von 40 getesteten typisierten Pneumokokkenstämmen mit Bindungswerten zwischen 6,1 % und 23,4 % spezifisch humanes Plasminogen gebunden hatten (Abb. 3). Über 26 % der Stämme zeigten eine Bindungsaktivität von über 15 %. Die Bindung von humanem Plasminogen erfolgte nicht Serotyp-spezifisch und war unabhängig von der Herkunft der Pneumokokken. So zeigen Nasopharynxisolate und Blutisolate ebenso eine Bindungsaktivität wie Stämme aus den unterschiedlichen Stammsammlungen. Des weiteren konnten keine Unterschiede im Plasminogenbindungsverhalten zwischen transparenten und opaquen Varianten beobachtet werden. Auch die unterschiedliche Ausprägung der Polysaccharidkapsel bei den verschiedenen Pneumokokkenisolaten zeigte keinen Einfluß auf die Bindung an Plasminogen. Mit einigen ausgewählten Pneumokokkenstämmen wurden Bindungsversuche mit radioaktiv markiertem Plasmin durchgeführt.



**Abbildung 4:**

Bindung von  $^{125}\text{I}$ -Plasmin an *Streptococcus pneumoniae* der Serotypen 35A (P37, NCTC 10319); Serotyp 2 (P51, ATCC 11733 und P115, D39); Serotyp 6A (P124, opaquer Phänotyp); sowie an das Trachealisolat (P129) und an den unbekapselten Stamm R6x (P139).

Die Bindung von  $^{125}\text{I}$ -Plasmin an verschiedene Serotypen wurde mit jeweils 37 nCi radioaktiv markiertem Protein ermittelt. Zur inhibition der proteolytischen Aktivität des Plasmins erfolgten die Versuche nach Zusatz von Aprotinin. Die Bindungswerte von humanem Plasmin lagen bei 3 - 4 % weit unterhalb der festgesetzten

Bindungsgrenze (Abb. 4). Die Bindungsversuche zeigten die Bindung von Plasminogen an verschiedene Serotypen von *Streptococcus pneumoniae* mit unterschiedlicher Bindungsaktivität und deuteten an, dass keine spezifische Bindung an Plasmin stattfindet.

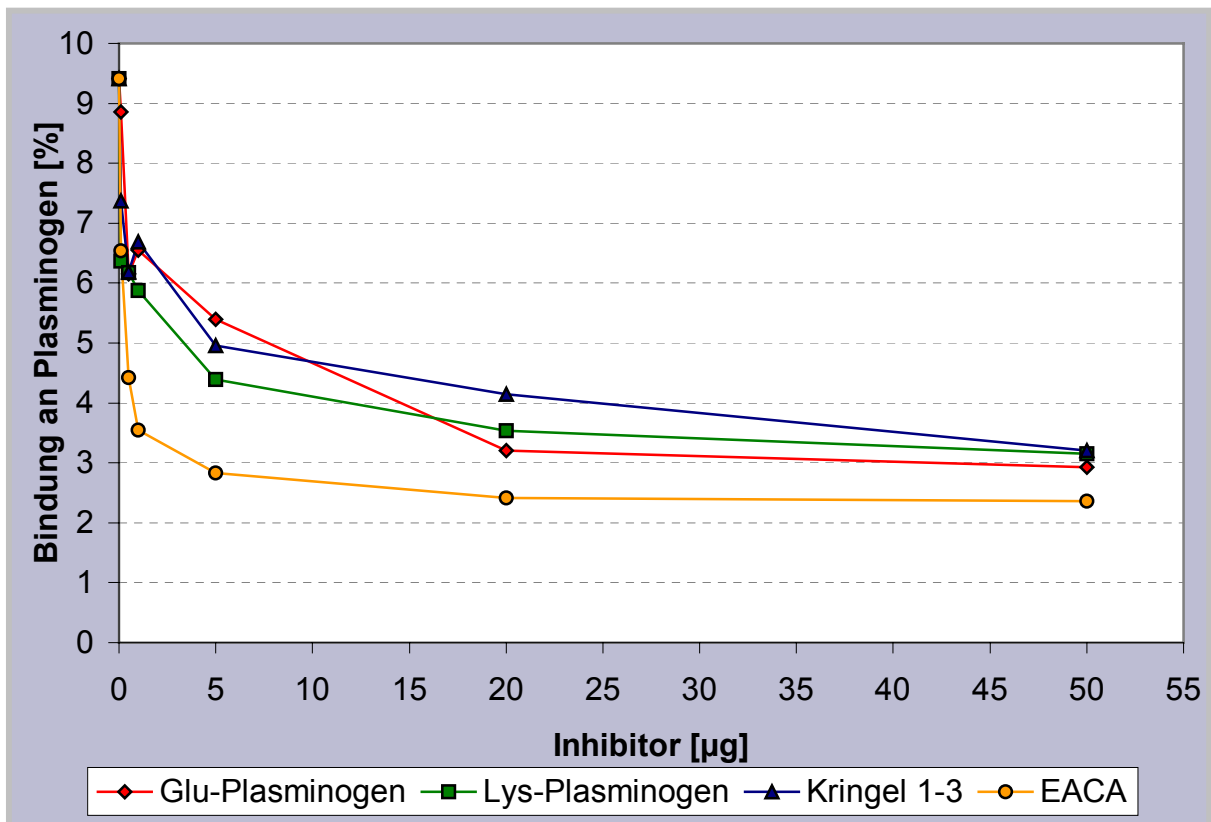
### 3.1.2 Charakterisierung der Plasminogenbindung durch *Streptococcus pneumoniae*

In Studien zur Bindungsspezifität wurde untersucht, ob die Zugabe von nicht-markiertem Glu-Plasminogen in steigenden Konzentrationen die Bindung von radioaktiv markiertem Glu-Plasminogen an intakte Pneumokokken durch Absättigung der vorhandenen Bindungsstellen auf der bakteriellen Oberfläche inhibiert.

Dazu wurde ein Inhibitionsversuch mit dem Pneumokokkenstamm R6x durchgeführt. Dieser Stamm zeigte eine Bindung von 22,78 % im Radioaktiv-Bindungsversuch mit  $^{125}\text{I}$ -Glu-Plasminogen (Abb. 3). Als nicht-radioaktiv-markierte Kompetitoren wurden ebenfalls die Plasminogenteilfragmente Lys-Plasminogen und die Kringeldomänen 1-3 sowie das Substratanalogon 6-Aminohexansäure (EACA, MG: 131,2 Da) verwendet. Lys-Plasminogen ist die um das N-terminale Peptid (MG: 5 kDa) verkürzte Plasminogenform. Die Kringeldomänen 1-3 enthalten drei der fünf Lysinbindungsstellen im Plasminogenmolekül. Bei EACA handelt es sich um ein synthetisches Substratanalogon mit spezifischen Bindungseigenschaften für die Lysinbindungsstellen der Kringeldomänen.

Die Inhibitionsstudien wurden mit 45 nCi radioaktiv markiertem Plasminogen durchgeführt. Von den nicht-markierten Inhibitorproteinen wurden 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg, 5 µg, 20 µg und 50 µg eingesetzt. Das Ergebnis zeigte eine Inhibition der Plasminogenbindung an Pneumokokken durch nicht-markiertes Glu-Plasminogen (Abb. 5). Die Bindung von radiokativ markiertem Plasminogen an *S. pneumoniae* wurde auch durch Zugabe der Kringeldomänen konzentrationsabhängig inhibiert (Abb. 5). Das Lys-Plasminogen zeigte ebenfalls inhibitorische Aktivität auf die Plasminogenbindung an Pneumokokken (Abb. 5). Die Werte für die halbmaximale Sättigung betrugen für Glu-Plasminogen 15,18 µg (0,17 µM), für Lys-Plasminogen 4,68 µg (55,1 nMol), 17,841 µg (0,54 µM) für die Kringeldomänen 1-3, und 0,803 µg (5,82 µM) für EACA. Die Ergebnisse der Inhibitionsversuche deuteten an, dass die

Interaktion von Plasminogen mit Pneumokokken über Oberflächenrezeptoren vermittelt wurde, die über exponierte Lysine an das Plasminogen binden.



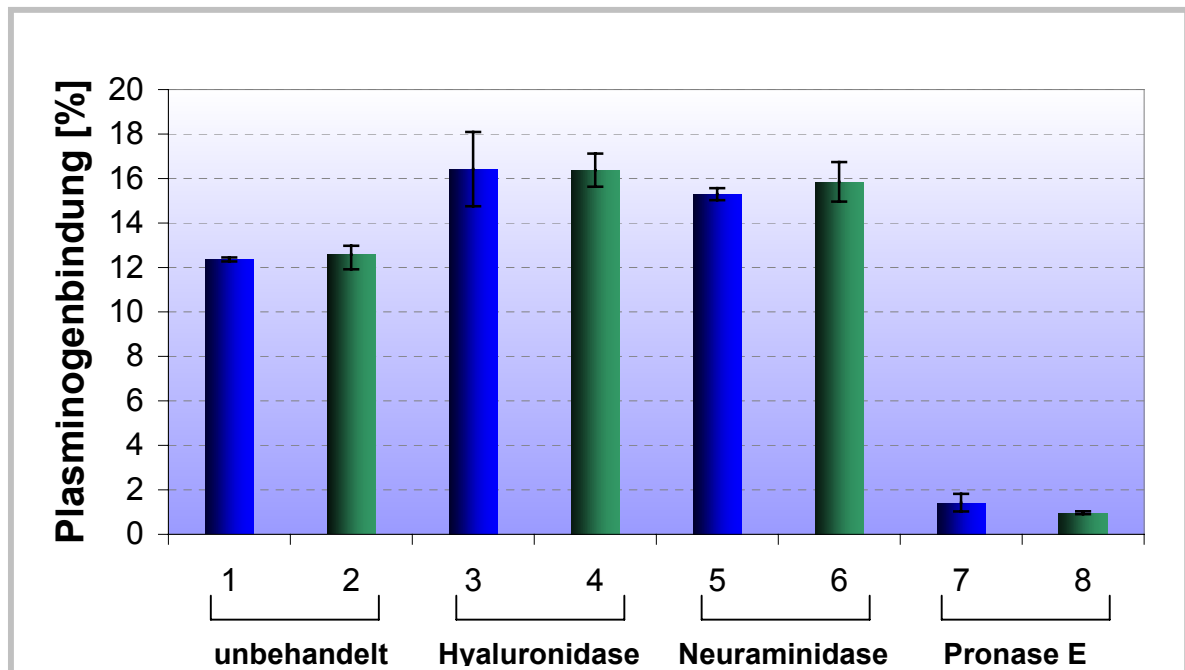
**Abbildung 5:**

Kompetitive Inhibition der Plasminogenbindung an Pneumokokken des Stammes R6x durch Glu-Plasminogen, Lys-Plasminogen, Kringeldomänen 1-3 und EACA.

### 3.1.3 Biochemische Charakterisierung der bakteriellen Adhäsine für Plasminogen

Zur Untersuchung der chemischen Zusammensetzung der Plasminogenrezeptoren, wurden Pneumokokken des bekapselten Serotyp 2-Stammes (ATCC 11733) und des unbekapselten Stammes R6x vor der Inkubation mit dem radioaktiv markierten Plasminogen mit unterschiedlichen Reagenzien vorbehandelt. Die Bakterien wurden vor dem Bindungsversuch mit Neuraminidase, Hyaluronidase und Pronase inkubiert. Neuraminidase bewirkt eine gezielte Abspaltung endständiger N-Acetyl-Neuraminsäure von Oberflächenpolysacchariden. Hyaluronidase bewirkt eine spezifische Abspaltung der endständigen Hyaluronsäuren und durch Inkubation der Pneumokokken mit dem proteolytischen Enzym Pronase E erfolgte eine

unspezifische Proteolyse der Proteinkomponenten an der bakteriellen Oberfläche. Im Anschluß an die jeweiligen Inkubationen wurde ein Bindungsversuch mit 54 nCi radioaktiv markiertem Plasminogen pro Ansatz durchgeführt. Zum Vergleich der Bindungsaktivitäten wurden unbehandelte Bakterien ebenfalls auf Plasminogenbindung getestet.



**Abbildung 6:**

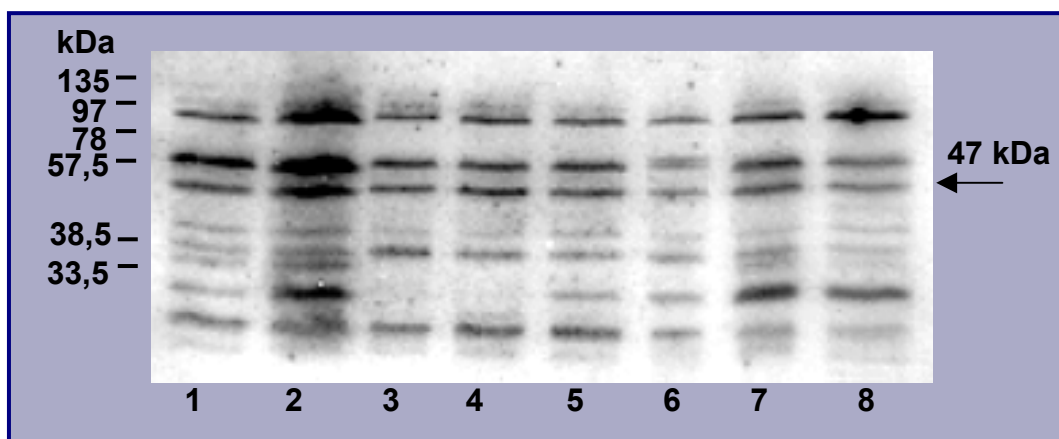
Bindung von  $^{125}\text{I}$ -Plasminogen an Pneumokokken R6x (blau) und Serotyp 2 (ATCC 11733, grün) ohne bzw. nach Inkubation mit verschiedenen Enzymen: **1, 2:** ohne Vorbehandlung; **3, 4:** nach Hyaluronidase-Inkubation; **5, 6:** nach Neuraminidase-Inkubation; **7, 8:** nach Pronase E-Inkubation.

Der unbekapselte Pneumokokkenstamm R6x und der Serotyp 2-Stamm (ATCC 11733) zeigten hierbei eine Bindungsaktivität von 12,36 % bzw. 12,58 % (Abb. 6). Nach Inkubation der Pneumokokken mit Hyaluronidase sowie nach Inkubation mit Neuraminidase wurde eine Bindung von 16,4 % bzw. 15,2 % gemessen. Im Gegensatz dazu konnte nach Proteolyse mit Pronase E (und mit Trypsin) eine stark reduzierte Plasminogenbindungsaktivität von 1,41 % bzw. 0,96 % für die unterschiedlichen Stämme gezeigt werden (Abb. 6). Die Auswertung zeigte nur nach proteolytischer Vorbehandlung eine signifikante Reduktion der Plasminogenbindung, während die Inkubation mit Hyaluronsäure und Neuraminidase keine Abnahme der Plasminogenbindung induzierte. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass es sich bei den

Plasminogenrezeptoren um Proteinkomponenten auf der Oberfläche von *S. pneumoniae* handelte.

### 3.1.4 Lokalisation von Plasminogenbindungsproteinen in unterschiedlichen Zellkompartimenten von *Streptococcus pneumoniae*

Zur Auftrennung und Molekulargewichtsbestimmung von potenziellen Plasminogenbindungsproteinen von *S. pneumoniae* wurde ein Blot-overlay mit radioaktiv markiertem humanem Plasminogen durchgeführt. Für diese Studien wurde die Bindung an Proteine von 8 verschiedenen Pneumokokkenstämmen, die im Bindungsversuch eine starke Plasminogenbindungsaktivität zeigten, untersucht. Es handelte sich hierbei um den unbekapselten Stamm R6x (P139), einen Serotyp 2-Stamm (P51, ATCC 11733), zwei Serotyp 9V-Stämme (klinisches Isolat P62 mit opakem Phänotyp und klinisches Isolat P64 mit transparentem Phänotyp), einen Serotyp 6A (klinisches Isolat P376 mit opakem Phänotyp), ein Nasopharynx-Isolat (P129), einen Serotyp 35A-Stamm (P37, NCTC 10139) und einem weiteren Serotyp 2-D39 (P115).

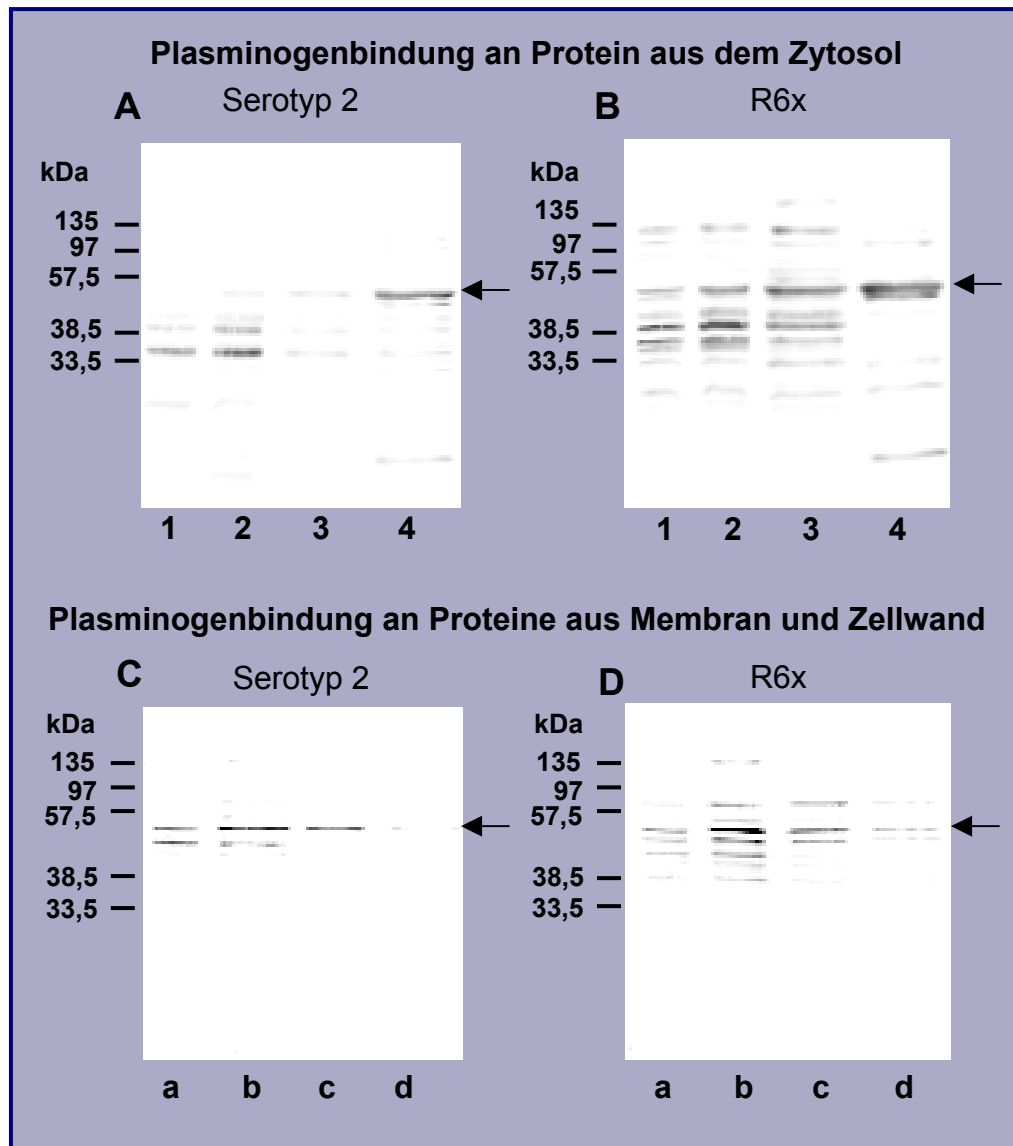


#### **Abbildung 7:**

Bindung von radioaktiv markiertem humanem Plasminogen an verschiedene Serotypen von *Streptococcus pneumoniae* im Blot overlay. 1: R6x (unbekapselt, P139); 2: *S. pneumoniae* Serotyp 2 (P51, ATCC 11733); 3: opaqueres klinisches Isolat P62, Serotyp 9V; 4: transparentes klinisches Isolat P64, Serotyp 9V; 5: opaqueres klinisches Isolat P376, Serotyp 6A; 6: Nasopharynx-Isolat 129; 7: Serotyp 35A (P37, NCTC 10139); 8: Serotyp 2 (P115, D39).

Für die unterschiedlichen Stämme konnten jeweils bis zu 9 reagierenden Banden nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht der Proteinbanden betrug 83 kDa, 56

kDa, 47 kDa, 39 kDa, 36 kDa, 34 kDa, 31 kDa, 27 kDa und 19 kDa (Abb. 7). Wurden die Pneumokokken vor dem Blot-overlay mit proteolytischen Enzymen vorbehandelt, konnte kein Protein nachgewiesen werden, welches mit Plasminogen reagierte. Die untersuchten *S. pneumoniae*-Stämme produzierten demnach in allen Stämmen ein ähnliches Repertoire unterschiedlicher Peptide bzw. Proteine mit Bindungseigenschaften für Plasminogen.



**Abbildung 8:**

Nachweis der Plasminogenbindung der präzipitierten Zytosolproteine und der mit CHAPS solubilisierten Zellwand- und Membranproteine von *Streptococcus pneumoniae* ATCC 11733 (Serotyp 2) bzw. R6x. **1:** 20 %  $\text{NH}_2\text{SO}_4$ ; **2:** 40 %  $\text{NH}_2\text{SO}_4$ ; **3:** 60 %  $\text{NH}_2\text{SO}_4$ ; **4:** 80 %  $\text{NH}_2\text{SO}_4$ ; **a:** 5 mM CHAPS; **b:** 10 mM CHAPS; **c:** 20 mM CHAPS; **d:** 50 mM CHAPS. Die Pfeile markieren die reagierende 47 kDa-Bande.

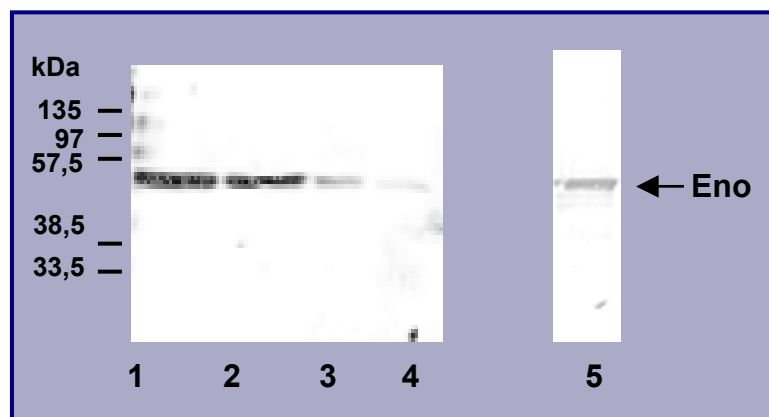


Zur subzellulären Lokalisation der im Blot-overlay-Versuch detektierten Plasminogenbindungsproteine wurden nach der Lyse der Bakterien die Zytosolproteine der Pneumokokken von den Zellwandkomponenten getrennt. Anschließend erfolgte die Solubilisierung der Zellwand- und Membranproteine durch fraktionierte Inkubation mit dem zwitterionischen Detergenz CHAPS. Nach der Aufkonzentration der Zytosolproteine durch Ammoniumsulfatpräzipitation, wurden die gewonnenen Zytosol- und Zellwandproteinfraktionen im Blot-Overlay auf Plasminogenbindung untersucht. In beiden Fraktionen konnte die bereits in den Gesamtzelllysaten detektierte 47 kDa Proteinbande aufgrund der starken Plasminogenbindungsaktivität nachgewiesen werden (Abb. 8, Pfeilmarkierungen). Darüberhinaus reagierten weitere Banden der Zytosolfraktion mit Plasminogen, von denen einige ebenfalls sowohl in der Membran- als auch in der Zellwandfraktion nachgewiesen werden konnten.

### **3.1.5 Identifikation eines Plasminogen- und Plasmin-Rezeptors von *Streptococcus pneumoniae***

Zur Identifikation eines Plasminogenbindungsproteins wurden die mit Plasminogen reagierenden Proteinfraktionen vereinigt, im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Entsprechend der Position der mit Plasminogen reagierenden Banden, wurden die relevanten Bereiche ausgeschnitten und einer N-terminalen Sequenzanalyse unterzogen. Eine der resultierenden Peptidsequenzen mit den Aminosäuren **MIITDVYAREVLDSRGNPP** zeigte 100 %ige Identität zu dem aminoterminalen Bereich eines 434 Aminosäuren umfassenden Proteins mit hypothetischer Funktion, das im Rahmen der Genomsequenzierung eines Serotyp 4-Stammes ([www.Tigr.org/tdb/mdb/mdbin-progress.html](http://www.Tigr.org/tdb/mdb/mdbin-progress.html)) identifiziert wurde (Contig 3836, Startposition 955457- Stopposition 956758). Dieses hypothetische Protein zeigte Homologie zu humanen Enolasen des  $\alpha$ ,  $\beta$ , und  $\gamma$ -Typs und zu Enolasen von anderen Gram-positiven Mikroorganismen wie *Bacillus subtilis*, *Streptococcus intermedius* und *Staphylococcus aureus* (Tab. 4). Die Sequenzvergleiche ergaben außerdem signifikante Ähnlichkeiten zu Enolase-kodierenden Genen Gram-negativer Bakterien wie *Enterococcus faecalis* und *Neisseria meningitidis* (Tab. 4). Die höchste Homologie von 93,6 % konnte in einem Homologievergleich nach Lipman und Pearson (Wilbur und Lipman, 1983) zur Enolase SEN (streptococcal surface

enolase) von *Streptococcus pyogenes* gezeigt werden (Pancholi und Fischetti, 1998). Die Aminosäuresequenz von SEN wurde unter Verwendung des TBLASTN-Algorithmus ([www.sanger.ac.uk / Projects / S\\_pyogenes / blast-server.html](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pyogenes/blast-server.html)) aus dem sequenzierten Genom eines *Streptococcus pyogenes* Isolates (Stammbezeichnung *Manfredo*, M5) aufgrund der Enolasesignatur ermittelt. Die 47 kDa Proteinbande von verschiedenen im SDS-Gel aufgetrennten Pneumokokkenlysaten zeigte im Immunblot darüber hinaus eindeutige Kreuzreaktivität mit einem (von V. Pancholi und V. Fischetti zur Verfügung gestellten) polyklonalen anti-SEN-Antiserum (*Abb. 9*). Das anti-SEN-Antiserum detektierte die Enolase sowohl in der Zytosol- als auch in der Zellwandproteinfraktion von *S. pneumoniae*.



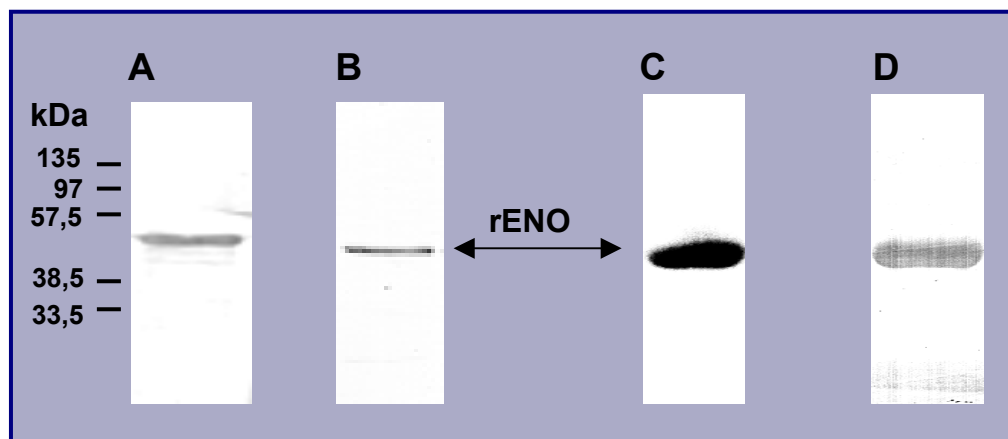
**Abbildung 9:**

Detektion der Enolase von *S. pneumoniae* durch Kreuzreaktivität mit dem anti-SEN-Antiserum in Lysaten und Zellwandfraktionen des unbekapselten Pneumokokkenstammes R6x (P139) und des Serotyp 2-Stammes ATCC11733 (P51). **1:** Bakterienlysat von P51 (ATCC11733); **2:** Bakterienlysat R6x (P139); **3:** Zellwandproteine von P51; **4:** Zellwandproteine von R6x (P139); **5:** rekombinantes Eno-Protein.

Bereits im Jahr 2000 erfolgte die Identifikation und Benennung der  $\alpha$ -Enolase-ähnlichen Proteinsequenz von *Streptococcus pneumoniae* mit der Bezeichnung „Eno“ (Rimini *et al.*, 2000). Anhand der teilweise annotierten DNA-Sequenz der Eno von *Streptococcus pneumoniae* wurden geeignete Oligonukleotide zur Expressionsklonierung des Gens in den pQE30-Vektor synthetisiert. Nach der Expression des Eno-Proteins erfolgte die affinitätschromatographische Aufreinigung mit Nickel-NTA-Agarose über den Tag aus 6 Histidinen am Aminoterminal des Eno-Proteins. Das rekombinante Eno-Protein (rEno) wurde verwendet, um ein anti-Eno-Antiserum durch Immunisierung von Kaninchen zu generieren. Die Plasminogen-

und Plasminbindungsaktivität des rekombinanten Proteins wurde im Folgenden näher untersucht. Die Detektion erfolgte sowohl mit anti-Plasminogen Antikörpern und Peroxidase gekoppeltem Zweitantikörper, als auch mit radioaktiv markiertem Plasminogen und Plasmin.

Das anti-Eno-Antiserum zeigte im Immunblot eine spezifische Reaktion mit dem rEno-Protein (Abb. 10A). Nach Inkubation mit humanem Plasminogen konnte eine starke Bindungsaktivität des gereinigten Eno-Proteins mit Plasminogen sowohl nach Entwicklung mit Peroxidase gekoppeltem Zweitantikörper (Abb. 10B), als auch mit dem radioaktiv markierten Plasminogen gezeigt werden (Abb. 10C). Das Eno-Protein zeigte darüber hinaus eine Bindung von iodiertem Plasmin, die jedoch mit schwächerer Affinität erfolgte als die Plasminogenbindung (Abb. 10D). Aufgrund der Bindungsstudien im Blo-overlay konnte die Eno von *S. pneumoniae* als Plasminogen- und Plasminbindungsprotein identifiziert werden.



**Abbildung 10:**

**A:** Immunblot des rekombinanten Eno-Proteins mit anti-Eno-Antiserum. **B:** Nachweis der Plasminogenbindung mit Peroxidase gekoppeltem Zweitantikörper im Protein-overlay. **C:** Bindung von rEno an radioaktiv markiertes Plasminogen (**C**) und Plasmin (**D**).

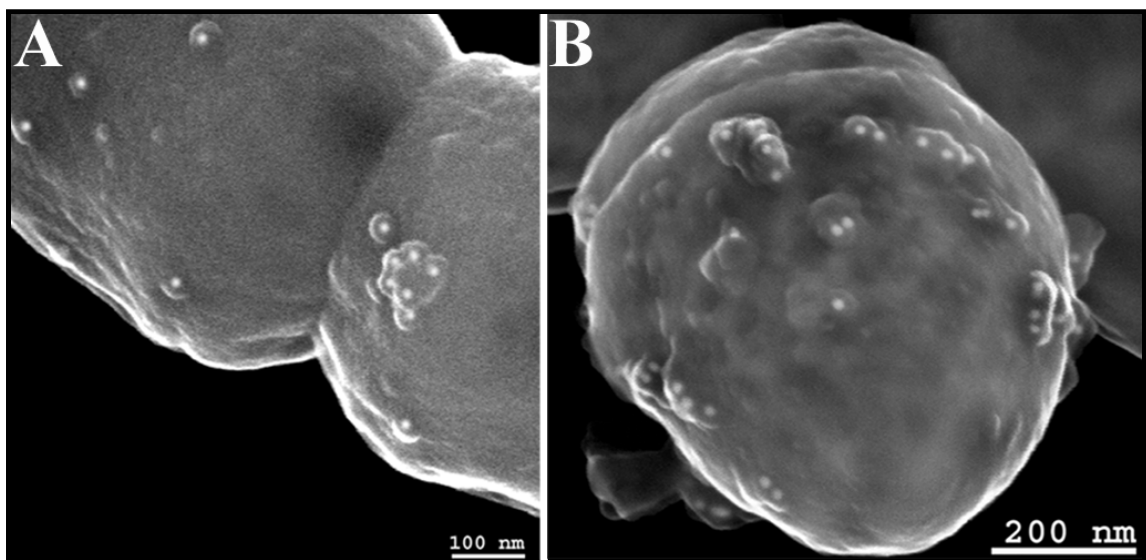
Die computerunterstützte Analyse der biochemischen Parameter erfolgte anhand der ExPASy-Servicesoftware ([http://expasy.proteome.org.au/cgi-bin/pi\\_tool](http://expasy.proteome.org.au/cgi-bin/pi_tool)) und ergab für die Proteinsequenz mit 434 Aminosäuren (Abb. 39) ein theoretisches Molekulargewicht von 47102,94 Da und einen pI bei 4,69. Nach anerkannter Enzymklassifikation wird die  $\alpha$ -Enolase als Phosphopyruvathydratase bzw 2-Phosphoglyceratdehydratase in die Hydrolyasen der Carbonoxygenlyasen mit der Bezeichnung E.C.4.2.1.11 eingeordnet. Die Veröffentlichung der Nukleotid- und

Aminosäuresequenz der  $\alpha$ -Enolase von einem *S. pneumoniae* Serotyp 2-Stamm (ATCC 11733), erfolgte im Oktober 2001 unter der Accession-Nr. AJ303085 und ist in Abbildung 39 dargestellt.

### 3.2 Elektronenmikroskopische Studien zur Plasminogenbindung

#### 3.2.1 Darstellung der Plasminogenbindung an der Oberfläche von *Streptococcus pneumoniae*

Zur Darstellung der Plasminogenbindung auf der Oberfläche von intakten Pneumokokken wurden elektronenmikroskopische Studien durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurde ein bekapselter Serotyp 2-Pneumokokkenstamm (ATCC 11733, P139) und ein unbekapselter Stamm (R6x, P51) verwendet. Beide Stämme zeigten sowohl in Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem Plasminogen als auch im Protein-overlay eine Bindung von Plasminogen.



**Abbildung 11:**

Feldemissionsrasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Plasminogenbindung an der Oberfläche von *S. pneumoniae* R6x (A) und dem Serotyp 2-Stamm P51, ATCC 11733 (B).

Die Bakterien wurden mit Plasminogen und anschließend mit anti-Plasminogen-Antikörpern inkubiert. Die Detektion der Plasminogenbindung erfolgte mit an Protein

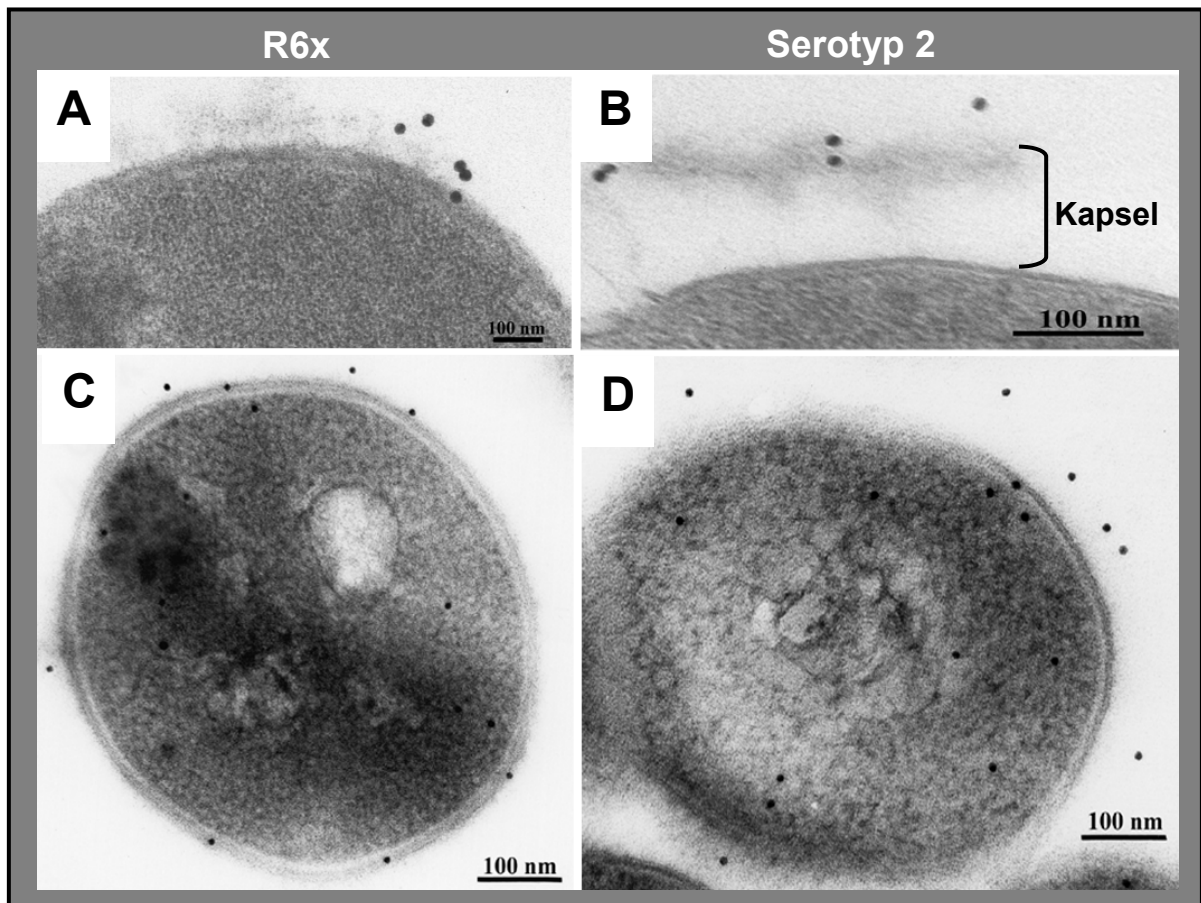
G gekoppelten Goldpartikeln (10 nm). In den dargestellten Aufnahmen des Feldemissionsrasterelektronenmikroskops (FESEM) konnten auf den Oberflächen beider Pneumokokkenstämme Plasminogenmoleküle detektiert werden (*Abb. 11*). Die Aufnahmen zeigten eine Detektion der Plasminogenbindung durch vereinzelte Goldsignale. Daneben sind Cluster von mehreren Goldpartikeln auf der Oberfläche beider Stämme zu erkennen (*Abb. 11*). Die Visualisierung der Plasminogenbindung durch elektronenmikroskopische Studien bewies die Lokalisation des Rezeptors für Plasminogen auf der Oberfläche von *S. pneumoniae*.

### **3.2.2 Subzelluläre Lokalisation des Enoproteins in den bakteriellen Kompartimenten**

Die Enolase ist ein Enzym, das aufgrund der Funktion in der Glykolyse hauptsächlich im zytosolischen Kompartiment des Bakteriums vorhanden ist. Zur näheren Lokalisation der Plasminogenbindung und des Eno-Proteins in anderen bakteriellen Kompartimenten, wurden weitere transmissionselektronenmikroskopische Studien durchgeführt. Die Detektion der Plasminogenbindung erfolgte im 'pre-embedding-labeling'-Verfahren. Nach Inkubation der Pneumokokkenisolate des Serotyp 2-Stammes (ATCC11733) und des Stammes R6x mit Plasminogen und Anti-Plasminogenantikörpern wurden die Bakterien fixiert und dehydriert. Nach der Einbettung in Acrylat-Harz, erfolgte die Herstellung von Ultradünnschnitten und die Analyse im Transmissionselektronenmikroskop.

Zur Lokalisation des Eno-Proteins wurden 'post-embedding labeling'-Studien mit anti-Eno-Antiserum durchgeführt. Dazu wurden Ultradünnschnitte der Bakterien mit polyklonalem anti-Eno-Antiserum inkubiert. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit Protein A-gekoppelten Goldpartikeln (10 nm). Die elektronenmikroskopische Analyse zeigte, dass die Plasminogenbindung an der Bakterienoberfläche des unbekapselten Isolats R6x stattfindet (*Abb. 12A*), während die Plasminogenbindung des bekapselten Serotyp 2-Stammes (ATCC 11733) in den äußeren Bereichen der Polysaccharidkapsel lokalisiert ist (*Abb. 12B*). In den Ultradünnschnitten beider Isolate konnte das Eno-Protein im Zytosol nachgewiesen werden (*Abb. 12C, D*). Darüber hinaus wurde es an der Innenseite der Zellmembran, in der Zellwand und auf der bakteriellen Oberfläche detektiert (*Abb. 12C, D*). In

Übereinstimmung zur Plasminogenbindung befindet sich das mit Goldpartikeln visualisierte Eno-Protein bei dem Serotyp 2 Stamm nicht direkt an der Oberfläche, sondern mit einem gewissen Abstand zur Zellwand am äußeren Rand der Kapselstruktur (Abb. 12B, D).



**Abbildung 12:**

Elektronenmikroskopische Darstellung der Detektion der Plasminogenbindung (A und B) und Lokalisation von Eno in verschiedenen Kompartimenten (C und D) von *S. pneumoniae* R6x (A und C) und des Serotyp 2-Stammes, ATCC11733 in Ultradünnschnitten (B und D).

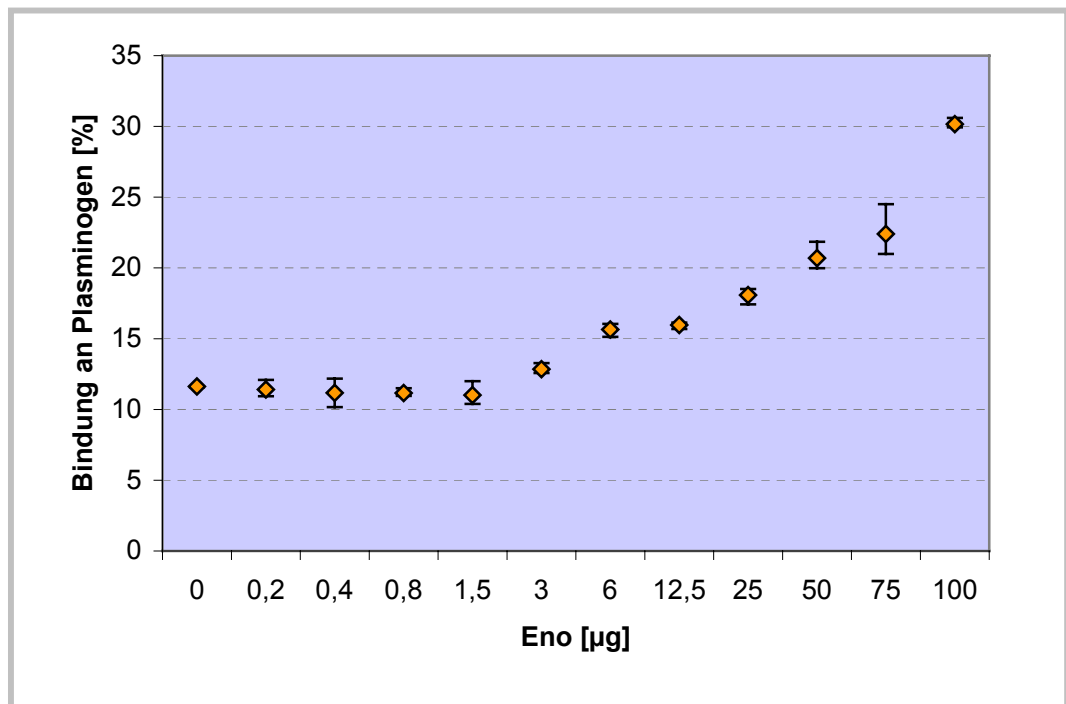
Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Studien bewiesen, dass das Eno-Protein an der Oberfläche von intakten Pneumokokken lokalisiert ist und daher in direktem Kontakt zu den Proteinen in der Wirtsmatrix treten kann. Die Analyse der Proteinsequenz des Eno-Proteins (Abb. 39) ergab, dass das Protein nicht über ein für Gram-positive Mikroorganismen typisches Signalpeptid und eine bekannte Protease-Erkennungssequenz verfügt, die für eine Sekretion an die Zelloberfläche notwendig wären (Blobel, 1980; Von Heijne und Blomberg, 1979). Das Protein

enthält auch keine ausgedehnten hydrophobe Bereiche zur integralen Verankerung in der lipophilen Zellmembran. Es fehlt außerdem das für Zellwandproteine gram-positiver Bakterien beschriebene Verankerungsmotiv LPXTGX (Fischetti *et al.*, 1990; Navarre und Schneewind, 1999). Des weiteren sind auch keine Cholinbindungsrepeats vorhanden, die bei einigen Oberflächenproteinen von *S. pneumoniae* eine Bindung an das Phosphorylcholin der Teichon- bzw. Lipoteichonsäuren der Zellwand vermittelt (Abb. 2).

### **3.3 Reassoziatio n von Eno an die Oberfläche von *Streptococcus pneumoniae***

#### **3.3.1 Plasminogenbindung von Pneumokokken nach Inkubation mit Eno**

Zur Analyse der Plasminogenbindung an weitere Oberflächenrezeptoren von *S. pneumoniae*, wurde ein Bindungsversuch mit radioaktiv markiertem Plasminogen durchgeführt. In diesem Versuch wurde das rekombinante Eno-Protein in einer Konzentrationsreihe von 0,2 µg bis 100 µg als nicht-markierter Inhibitor eingesetzt. Nach Zugabe von 45 nCi radioaktiv markiertem Plasminogen wurde für jede Inhibitorkonzentration in drei unabhängigen Ansätzen die Bindung von Plasminogen bestimmt. Das Ergebnis zeigte keine kompetitive Inhibition der Plasminogenbindung nach Präinkubation mit steigenden Konzentrationen an Eno, sondern eine sukzessive Zunahme der Plasminogenbindung um das 2,6 fache von 11,62 % auf 30,16 % bei steigender Eno-Konzentration (Abb. 13). Zur Kontrolle erfolgte ein Bindungsversuch nach Präinkubation mit 10 µg, 20 µg, 50 µg und 100 µg des SpsA-Proteins. Hierbei konnte keine deutliche Veränderung der Plasminogenbindung durch *S. pneumoniae* festgestellt werden. Die Bindungswerte lagen bei 13,0 % ± 0,83 % nach Zugabe von 10 µg Protein und bei 12,28 % ± 0,09 % nach Präinkubation mit 100 µg SpsA-Protein.



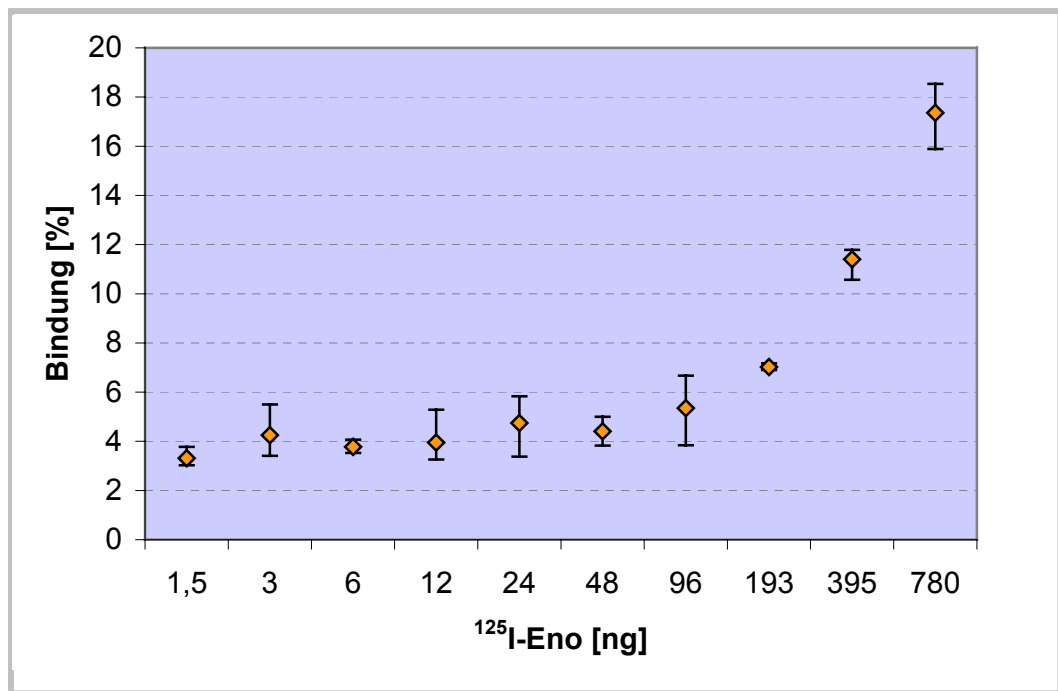
**Abbildung 13:**

Bindung von  $^{125}\text{I}$ -radioaktiv markiertem Plasminogen an *S. pneumoniae* R6x nach Zugabe von Eno.

### 3.3.2 Bindungsanalysen zur Interaktion von Eno mit *Streptococcus pneumoniae*

Zur näheren Untersuchung der im Inhibitionsversuch beobachteten verstärkten Plasminogenbindung wurde das rekombinante Eno-Protein radioaktiv markiert und als Ligand in steigenden Konzentrationen zwischen 1,5 ng und 780 ng in einem Bindungsversuch mit *Streptococcus pneumoniae* R6x eingesetzt.





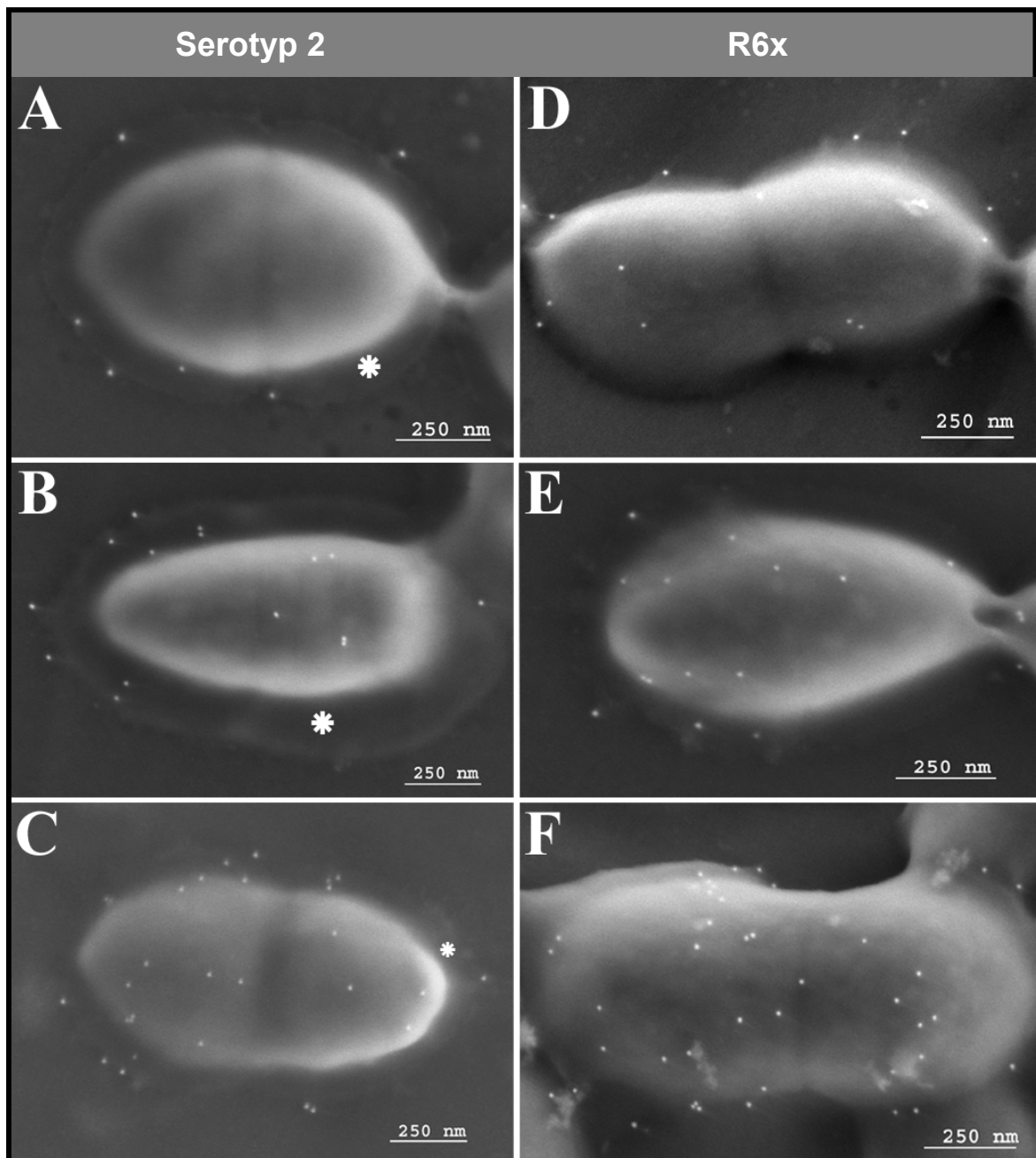
**Abbildung 14:**

Bindung von  $^{125}\text{I}$ -radioaktiv markiertem Eno-Protein an *S. pneumoniae* R6x.

Die Bindungswerte zeigten, dass das radioaktiv markierte Eno-Protein an Pneumokokken gebunden hatte und dass die Eno-Bindung an *S. pneumoniae* mit der eingesetzten Konzentration von Eno korrelierte (Abb. 14).

### 3.3.3 Elektronenmikroskopische Darstellung der Reassoziaton von Eno an die Oberfläche von *Streptococcus pneumoniae*

In elektronenmikroskopische Analysen wurde die im Bindungsversuch beobachtete Bindung von Eno an *Streptococcus pneumoniae*-Bakterien eingehender untersucht. Bakterien des R6x- und eines Serotyp 2-Stammes (ATCC 11733) wurden mit 1  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$  und 20  $\mu\text{g}$  Eno-Protein präinkubiert. Anschließend wurde das gebundene Eno-Protein mit anti-Eno-Antiserum und Protein A-Goldpartikeln detektiert. Es zeigte sich, dass nach Präinkubation der Pneumokokken mit höheren Eno-Konzentrationen deutlich mehr Eno-Protein auf der bakteriellen Oberfläche nachgewiesen werden konnte (Abb. 15). Durch die gewählte Abbildung im 'low voltage Mode' des FESEM konnte gleichzeitig die Pneumokokken-Kapsel dargestellt werden.



**Abbildung 15:**

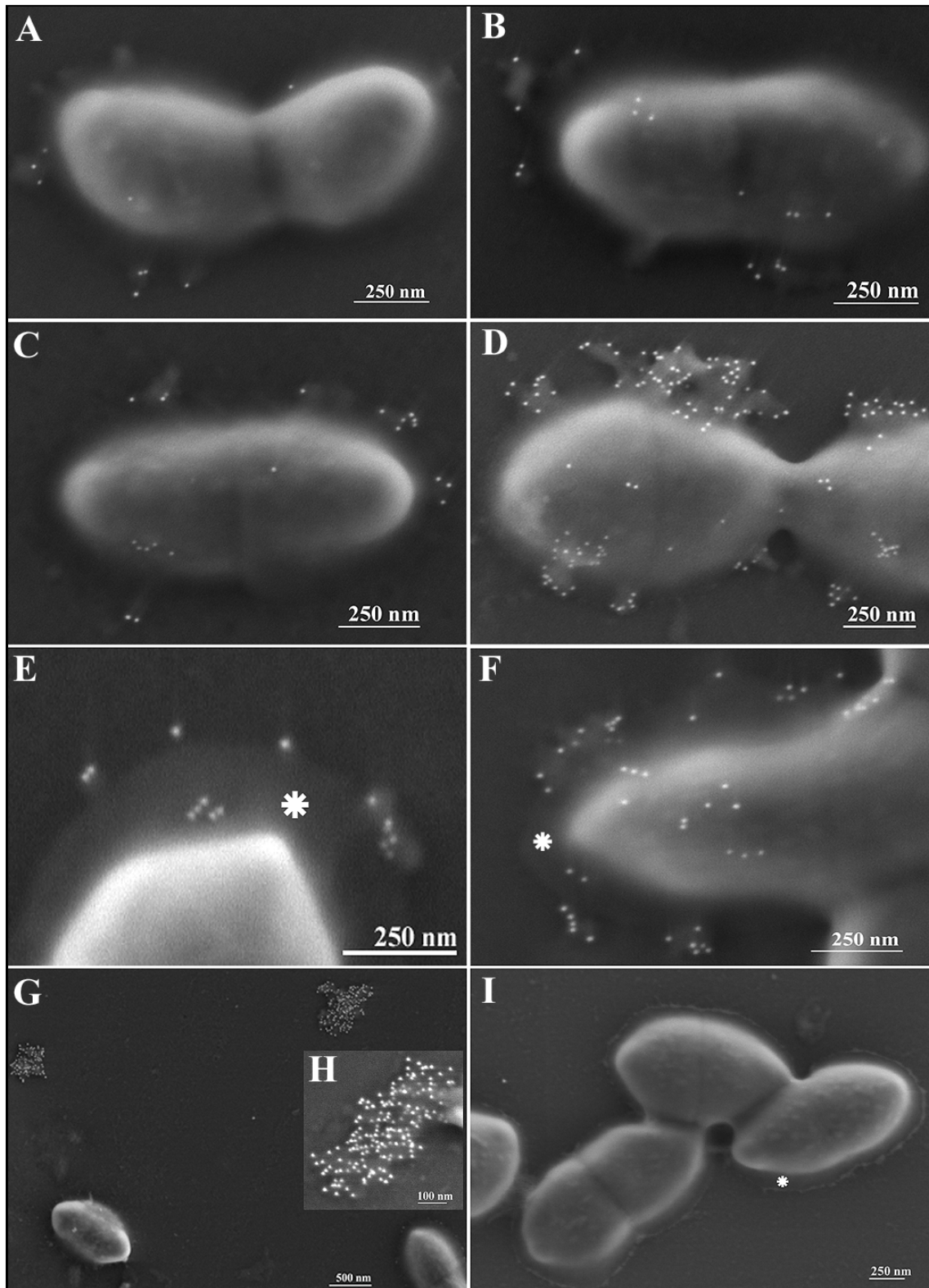
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der konzentrationsabhängigen Reassoziations von Eno-Protein an die Oberfläche von *S. pneumoniae* R6x (**A-C**) und dem Serotyp 2-Stamm ATCC 11733 (**D-F**) nach Präinkubation mit 1 µg Eno-Protein (**A** und **D**), 5 µg Eno-Protein (**B** und **E**) und 20 µg Eno-Protein (**C** und **F**). Das Sternchen-Symbol markiert den Bereich des Kapselpolysaccharids.

Man erkennt, dass das Eno-Protein hauptsächlich mit der Kapselstruktur des Serotyp-2-Stammes assoziiert vorliegt (**Abb. 15B**).

### 3.3.4 Elektronenmikroskopische Analyse der Plasminogenbindung nach Reassoziaton von Eno

Die Plasminogenbindungsstudien von zwei Pneumokkenisolaten zeigten eine deutliche Zunahme der Plasminogenbindung nach Eno-Präinkubation mit steigender Konzentration an eingesetztem Eno-Protein. In elektronenmikroskopischen Studien wurde nach Inkubation des bekapselten Pneumokokkenstammes R6x und des unbekapselten Serotyp 2-Stammes mit jeweils 1 µg, 5 µg bzw. 20 µg Eno-Protein der Effekt auf die Plasminogenbindung der Pneumokokken untersucht.

Die Auswertung in der Elektronenmikroskopie zeigte eine direkte Korrelation der Menge an präinkubiertem Eno-Protein und der Plasminogenbindung auf der bakteriellen Oberfläche von *S. pneumoniae* (Abb. 16). Dies konnte für die unbekapselten Stamm R6x als auch für den bekapselten Serotyp 2-Stamm (ATCC 11733) beobachtet werden (Abb. 16). Die Inkubation des Eno-Proteins und des Plasminogens in äquimolaren Mengen erfolgte zeitgleich in parallelen Ansätzen. Die Auswertung der mikroskopischen Analyse ergab, dass nach Inkubation der Pneumokokken mit einem Eno-Plasminogengemisch kein Plasminogen an der bakteriellen Oberfläche nachgewiesen werden konnte, sondern große Proteinaggregate ungebunden vorlagen (Abb. 16G, H). In Bindungsversuchen mit einem radioaktiv markierten Gemisch aus Eno-Protein und Plasminogen zeigten Pneumokokken eine stark verringerte Bindung im Vergleich zur Interaktion mit einem der beiden Komponenten allein. Die Ergebnisse der Bindungsstudien bestätigten damit die elektronenmikroskopischen Analysen. Zur Kontrolle, dass keine Kreuzreaktion des anti-Plasminogen-Antiserum mit der Pneumokokkenoberfläche bzw. mit dem Eno-Protein stattgefunden hat, erfolgte die Inkubation von 20 µg Eno-Protein und anti-Plasminogen-Antikörpern mit Bakterien des bekapselten Stammes ATCC 11733 (Abb. 16I).



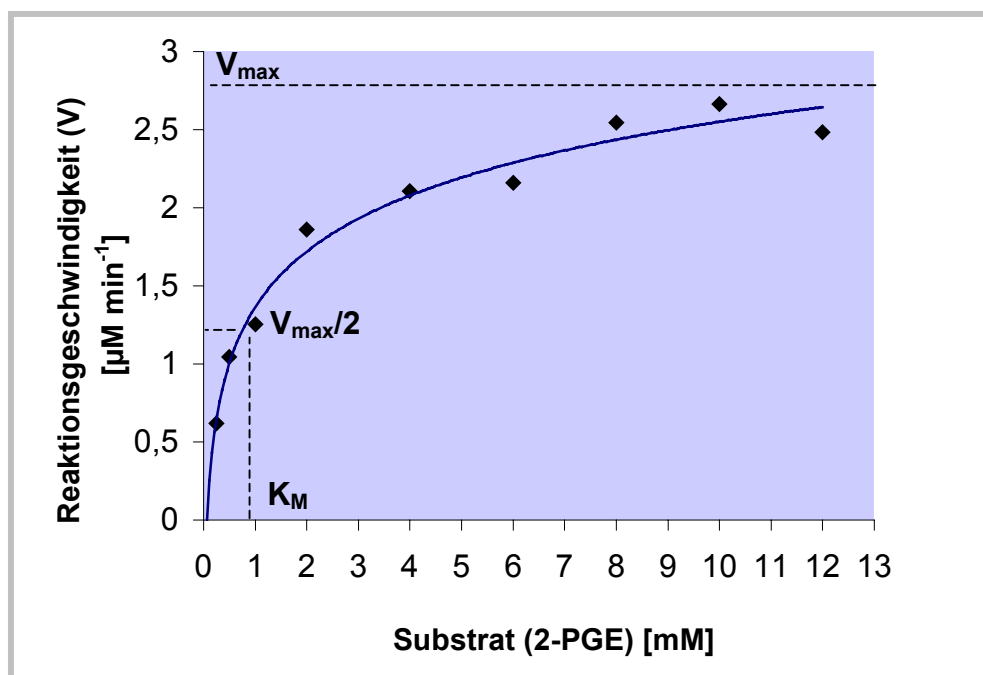
**Abbildung 16:**

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Plasminogenbindung von *S. pneumoniae* R6x (A-D) nach Inkubation mit 1 µg Eno-Protein (B), 5 µg (C) und 20 µg (D), sowie des Serotyp 2-Stammes ATCC 11733 (E+F) nach Präinkubation mit 5 µg Eno-Protein (E) und 20 µg (F). G: Plasminogenbindung nach Inkubation mit einem Eno-Plasminogen-Gemisch. H: Vergrößerung der Aggregatbildung. I: Pneumokokken nach Inkubation mit 20 µg Eno-Protein und anti-Plasminogen-Antikörpern ohne Zugabe von Plasminogen als Negativkontrolle. Das Sternchen-Symbol markiert den Bereich des Kapselpolysaccharids.

### 3.4 Charakterisierung des Glykolyseenzym ENO

#### 3.4.1 Feststellung der Kinetikparameter des Enolase-Enzyms

Eine wichtige physiologische Funktion der  $\alpha$ -Enolase ist die enzymatische Umsetzung von 2-Phosphoglycerinsäure zu Phosphoenolpyruvat. Die Aktivität des katalytischen Zentrums wird dabei von der korrekten Faltung des Proteins in die adäquate Tertiärstruktur beeinflusst. Zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität des rekombinanten Eno-Proteins, wurde in einer Enzymkinetik die Bildung von Phosphoenolpyruvat bei 240 nm photometrisch bestimmt. Während ohne Zugabe von 2-Phosphoglycerinsäure keine enzymatische Aktivität gemessen wurde, erfolgte die Umsetzung zu Phosphoenolpyruvat in direkter Korrelation zur Menge an eingesetztem Eno-Protein.



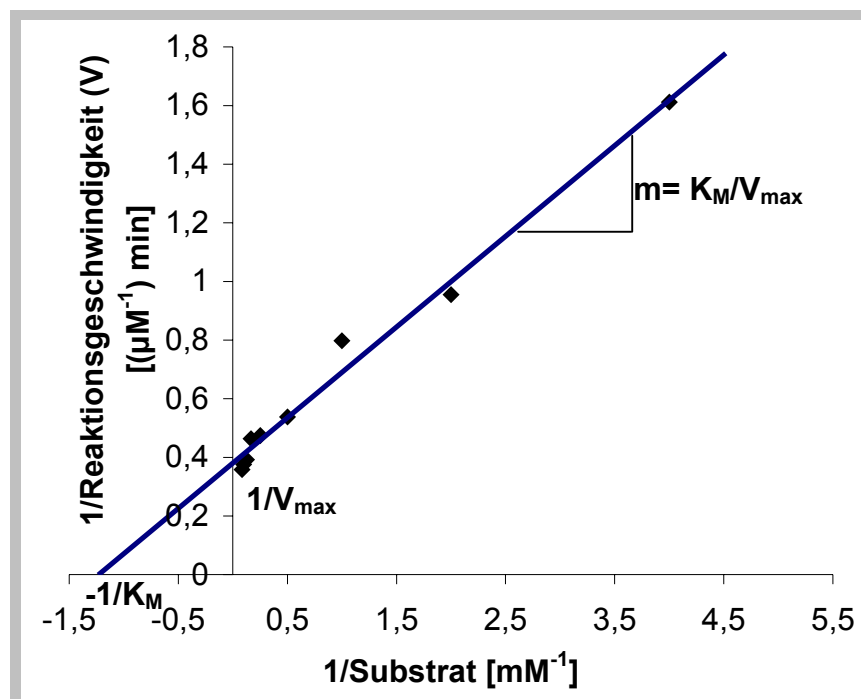
**Abbildung 17:**

Enzymaktivität von Eno als Funktion der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration und graphische Bestimmung der Kinetikparameter  $K_M$  und  $V_{max}$  nach Michaelis-Menten.

In der kinetischen Analyse der Enolasereaktion mit 5  $\mu$ g Eno und verschiedenen Konzentration an 2-Phosphoglycerinsäure (2-PGE) zwischen 0,25 mM und 12 mM, konnten die enzymatischen Parameter bestimmt werden. Die Darstellung der

Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration ermöglichte die Bestimmung der Michaeliskonstante  $K_M$  mit ca. 1,3 mM. Die Michaeliskonstante  $K_M$  ist ein Maß für die Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit. Ein weiterer Reaktionsparameter ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{\max}$ .  $V_{\max}$  konnte in diesem Versuch mit ca. 2,75  $\mu\text{M min}^{-1}$  bestimmt werden (Abb. 17).

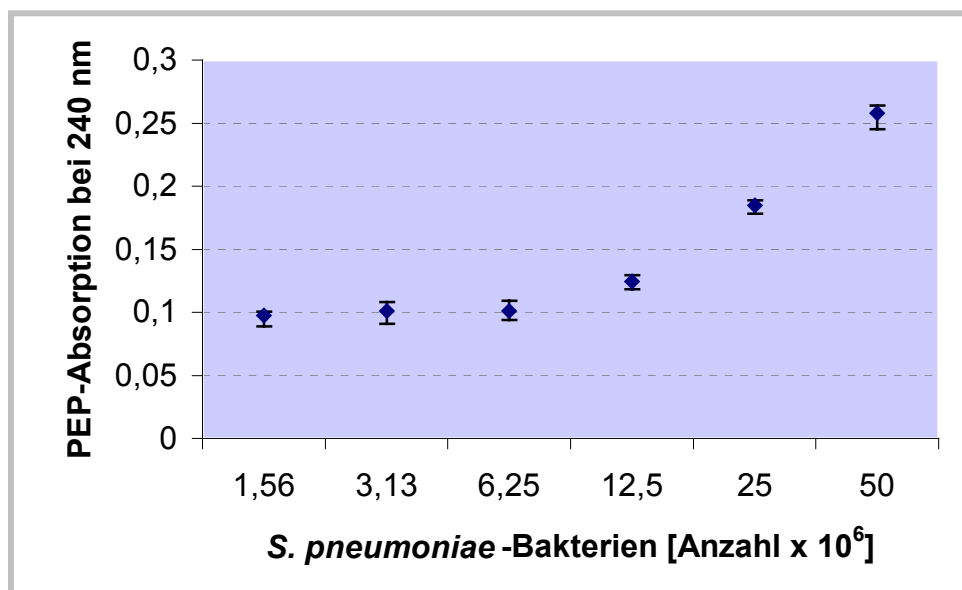
Die reziproke Darstellung der Enzymkinetik nach Lineweaver-Burk (Abb. 18) ermöglicht eine lineare Darstellung der Enzymreaktion. Dabei entspricht die Steigung der Geraden  $K_M/V_{\max}$ , der Ordinatenabschnitt  $V_{\max}^{-1}$  und der extrapolierte Abzissenabschnitt  $-1/K_M$ . Aus dieser Darstellung ergaben sich die Werte 2,6  $\mu\text{M min}^{-1}$  für  $V_{\max}$  und 0,77 mmol für  $K_M$ . Die Berechnung der Enzymparameter nach den Rohdaten ergab 4,5 mmol für  $K_M$  und 2,792  $\mu\text{M min}^{-1}$  für  $V_{\max}$ . Die nachgewiesene enzymatische Aktivität des rekombinanten Eno-Proteins war ein wichtiger Hinweis darauf, dass das Protein in seiner natürlichen Molekülstruktur vorlag und damit die gleichen Eigenschaften aufwies, wie das von *S. pneumoniae* exprimierte Eno-Protein.



**Abbildung 18:** Darstellung der Enolaseaktivität von Eno nach Lineweaver-Burk. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Y-Achse ergibt den Wert für  $V_{\max}^{-1}$ . Der Wert für  $K_M^{-1}$  kann durch den Schnittpunkt mit der X-Achse graphisch ermittelt werden.

### 3.4.2 Studien zur Enolaseaktivität auf der Oberfläche von *S. pneumoniae*

Zur Untersuchung der Enzymaktivität der Enolase auf der Oberfläche der Pneumokokken wurden  $1,56 \times 10^6$  und  $5 \times 10^7$  Bakterien des Stammes R6x für 3 min mit 3 mM 2-Phosphoglycerinsäure (2-PGE) präinkubiert. Die Freisetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) in 100 µl des Überstandes wurden im Anschluss photometrisch bestimmt. Die graphische Darstellung der PEP-Absorption zeigte eine Enolaseaktivität auf der Oberfläche von intakten Pneumokokken des unbekapselten Stammes R6x (Abb. 19).



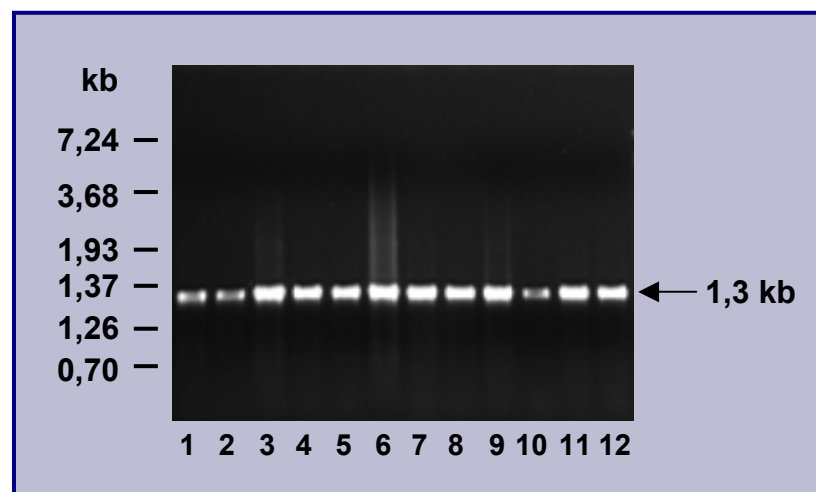
**Abbildung 19:** Enzymaktivität von *Streptococcus pneumoniae* R6x.

*S. pneumoniae*-Bakterien eines bekapselten Serotyp 2-Stammes (ATCC 11733) zeigten ebenfalls eine Enzymaktivität (Abb. 19). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass es sich bei dem oberflächenlokalisierten Eno-Protein mit Plasmin(ogen)-Bindungseigenschaft um das enzymatisch aktive Glykolyseenzym des Zytosols handelte und diese Aktivität auch auf der Oberfläche vorhanden ist. Zur Kontrolle erfolgte die Vermessung von Bakterienüberstand ohne Substratpräinkubation und von 50 µg SpsA-Protein nach Inkubation mit 2-PGE. Die Messung der Produktabsorption nach enzymatischer Aktivität von SpsA ergab einen Wert von  $0,021 \pm 0,003$ , der somit als Hintergrund-Absorption bewertet wurde. Ohne Präinkubation mit 2-PGE wurde eine Absorption von  $0,0175 \pm 0,0065$  gemessen.

### 3.5 Molekulare und Biochemische Charakterisierung der Enolase von *Streptococcus pneumoniae*

#### 3.5.1 Molekulare Analyse von *eno*-Gens von verschiedenen *Streptococcus pneumoniae*-Serotypen

Bei der Enolase handelt es sich um ein für das Überleben des Mikroorganismus essentielles Enzym des Energiestoffwechsels. Das Gen für die Enolase wurde aus dem Genom von 26 verschiedene Pneumokokken-Serotypen mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Die Analyse der PCR-Produkte im Agarosegel ergab, dass aus der genomischen DNA von jedem Pneumokokkenstamm ein DNA-Fragment amplifiziert werden konnte. Das PCR-Produkt zeigte in jedem Stamm eine einheitliche Größe von 1,3 kb (Abb. 20). Diese Fragmentgröße entspricht der Größe des *eno*-Gens im sequenzierten Genom eines Serotyp 4-Pneumokokkus.



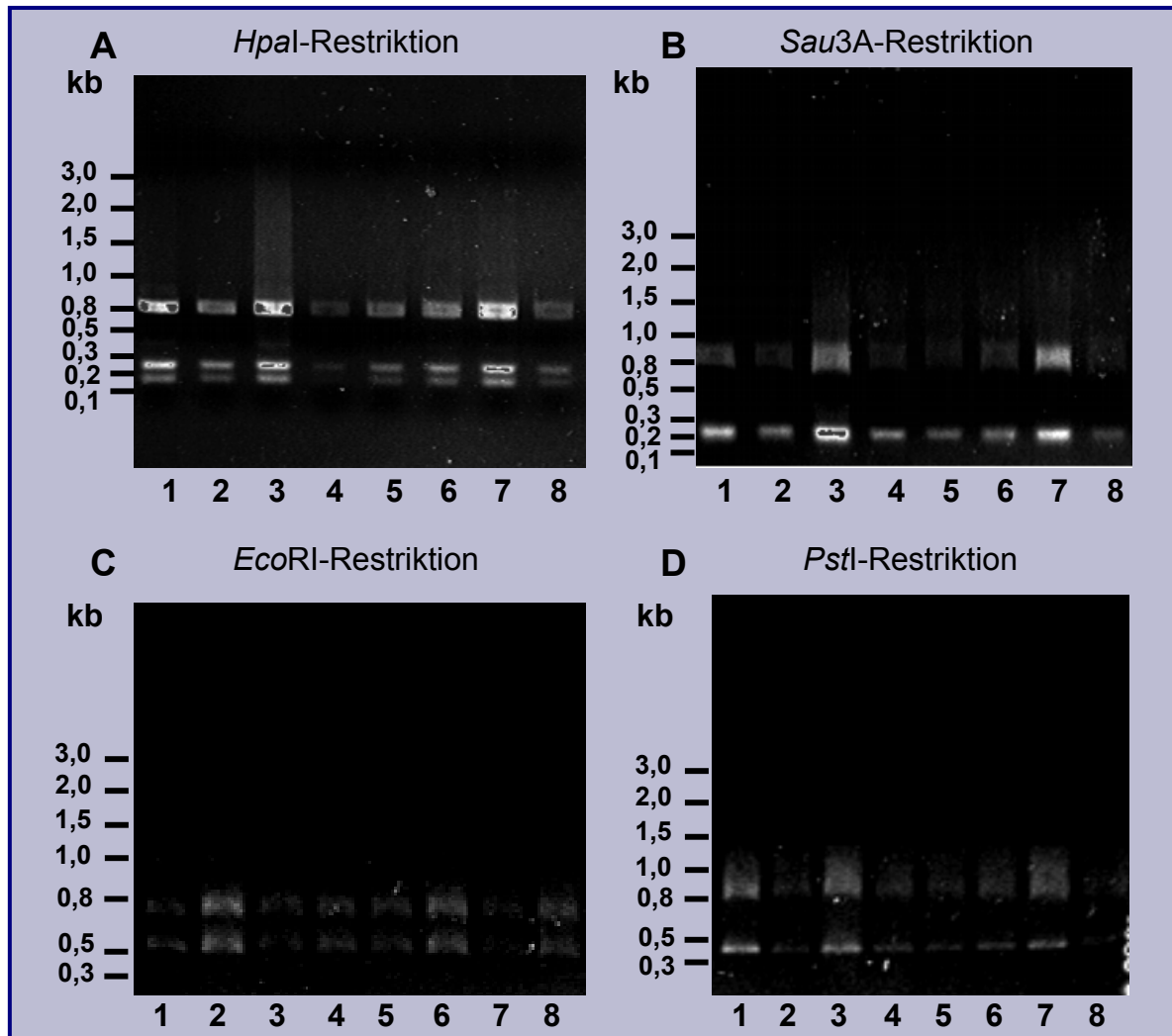
**Abbildung 20:**

PCR-Produkte nach Amplifikation des *eno*-Gens aus verschiedenen *Streptococcus pneumoniae*-Stämmen. 1: Serotyp 19F (P63); 2: Serotyp 2 (D39, P115); 3: Serotyp 35A (P37); 4: ATCC 11733 (Serotyp 2, P51); 5: R6x (P139); 6: Serotyp 4 (P55); 7: Blutisolat Typ 6A (P76); 8: Blutisolat 24F (P94); 9: Serotyp 9V (P106); 10: Serotyp 14A (P84); 11: Serotyp 23F (P112); 12: Serotyp 18F(P107).

Im Anschluß an die PCR-Reaktion wurde eine Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden die PCR-Amplifikate mit den Restriktionsenzymen *HpaI*, *Sau3A*, *EcoRI* bzw. *PstI* inkubiert. Nach der Restriktion mit dem gleichen Enzym zeigten die verschiedenen PCR-Fragmente ein identisches Restriktionsmuster (Abb. 21). Anhand der DNA-Sequenz eines Serotyp



4-Stammes wurde eine Restriktionskarte der Schnittstellenpositionen in der *eno*-Sequenz erstellt. Die *eno*-DNA-Sequenz enthielt zwei *HpaI*-Erkennungssequenzen an den Positionen 846 bp und 1032 bp. Im *eno*-Gen konnten außerdem drei *Sau3A*-Restriktionsschnittstellen an den Positionen 255 bp, 281 bp und 497 bp und eine *EcoRI*-Schnittstelle an der Position 739 bp festgestellt werden. Für das Restriktionsenzym *PstI* wurde eine Erkennungssequenz an Position 816 bp gezeigt.



**Abbildung 21:**

Restriktion des *eno*-Gens mit den Enzymen *HpaI* (A), *Sau3A* (B), *EcoRI* (C), *PstI* (D) nach Amplifikation aus den *S. pneumoniae*-Stämmen. 1: Serotyp 35A (P37); 2: Serotyp 2 (ATCC 11733, P51); 3: Serotyp 4 (P55); 4: Serotyp 19F (P63); 5: Serotyp 24F (P94); 6: Serotyp 18F (P107); 7: R6x (P139); 8: Serotyp 2 (D39, P115).

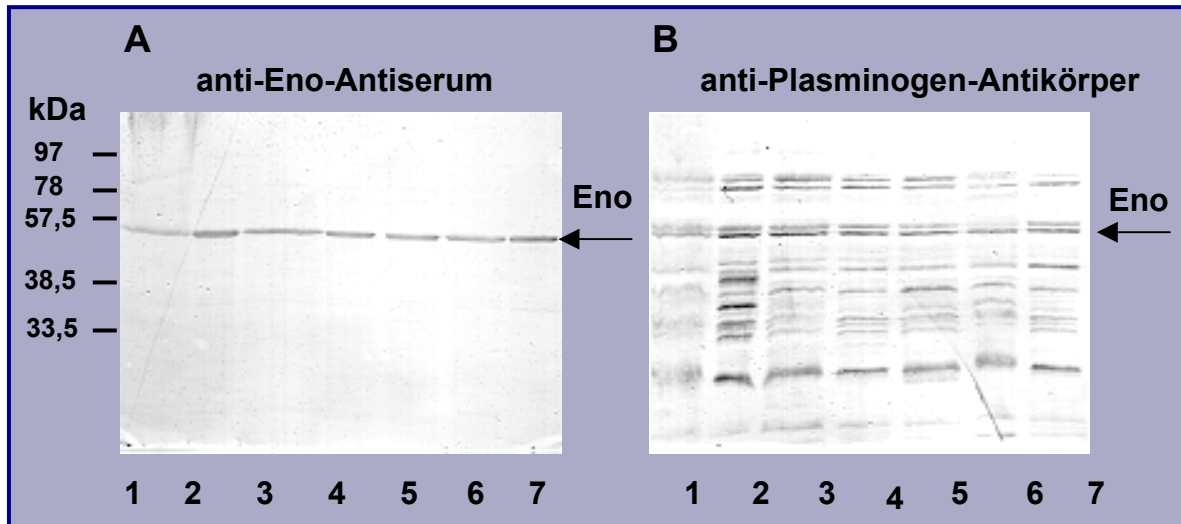
Die Analyse der DNA-Restriktion mit den unterschiedlichen Enzymen ergab, dass für jedes PCR-Produkt die erwarteten Fragmentgrößen nachgewiesen werden konnten

(Abb. 21). Nach der Restriktion mit dem Enzym *Sau3A* wurden drei Fragmente mit einer Größe von ca. 808 bp, 216 bp und 242 bzw. 26 bp erwartet. Im Agarosegel wurden zwei Restriktionsprodukte mit ca. 800 bp und ca. 220 bp detektiert (Abb. 21). Das 26 bp-Fragment konnte aufgrund der geringen Größe im 1,0 %igen Agarosegel nicht dargestellt werden. Die Restriktionsfragmente 216 bp und 242 bp konnten aufgrund des geringen Größenunterschieds im 1,0 %igen Agarosegel ebenfalls nicht als zwei getrennte DNA-Banden nachgewiesen werden. Die Größen der nach dem Restriktionsverdau mit den unterschiedlichen Enzymen resultierenden Fragmente aus dem Genom jedes Pneumokokkenstammes stimmten mit denen der computerbasierten Restriktionsanalyse überein (Abb. 21). Das Gen *eno* ist demnach in jedem Serotyp vorhanden und ist in Bezug auf Molekulargewicht und Anzahl sowie Position der Restriktionsschnittstellen in den einzelnen Isolaten hoch konserviert.

In Southern-Blot-Analysen wurde die genomische DNA verschiedener Pneumokokken-Serotypen mit einer *eno*-spezifischen DIG-markierten DNA-Sonde hybridisiert. Nach der Hybridisierung konnte ein 1300 bp großes DNA-Fragment detektiert werden. Zur Analyse der Expression auf Transkriptionsebene wurden Hybridisierungsstudien nach einem Northern-Transfer mit isolierter mRNA von verschiedenen *S. pneumoniae*-Serotypen durchgeführt. Das Ergebnis der Northern-blot Analyse zeigte eine monocistronische Organisation mit einem Transkriptionsprodukt von ca. 1300 bp in allen untersuchten Stämmen.

### **3.5.2 Expressionsstudien zur Plasminogenbindungseigenschaft der Enolase von *S. pneumoniae***

Die Expression von Eno als Plasminogenbindungsprotein wurde im Plasminogen-Blot-overlay mit 20 der bereits in der RFLP-Analyse untersuchten Pneumokokkenstämme verschiedenen Serotyps untersucht. Zur Kontrolle der Proteinexpression in den einzelnen Stämmen erfolgte die Entwicklung des Immunblots mit polyklonalem anti-Eno-Antiserum. Im Immunblot konnte für jeden Pneumokokkenstamm das Eno-Protein als 47 kDa Bande nachgewiesen werden (Abb. 22A).



**Abbildung 22:**

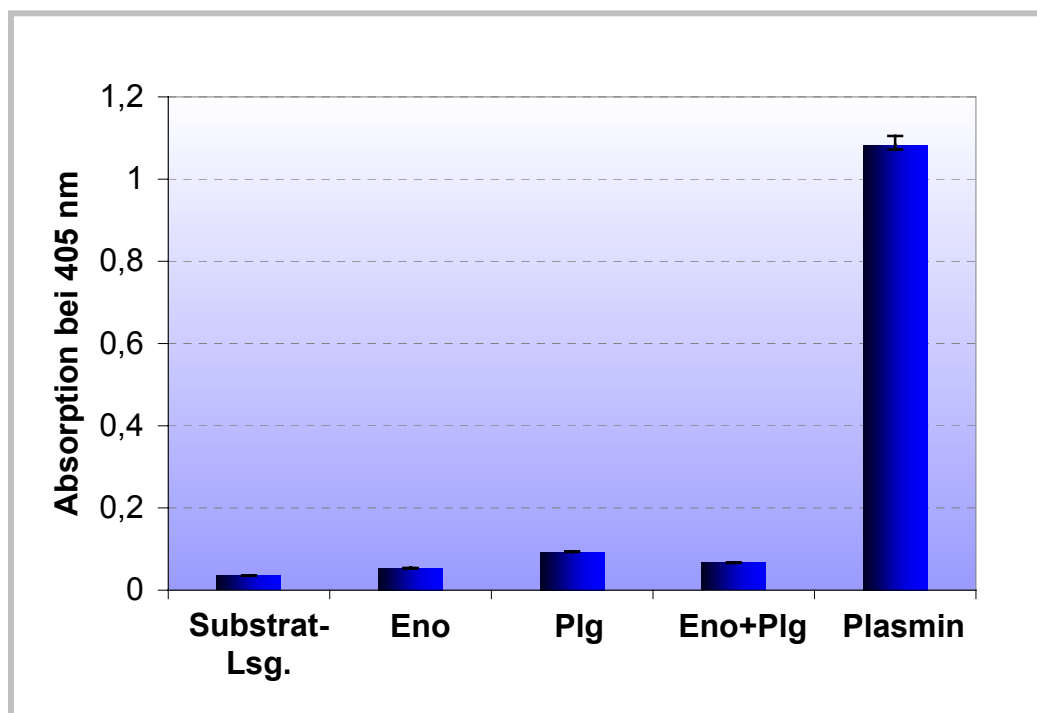
Expression des Eno-Proteins in *S. pneumoniae*-Stämmen mit Plasminogenbindungsaktivität im Immunblot (A) und im Plasminogen Blot-overlay (B). 1: Serotyp 35A (NCTC 10319, P37); 2: Serotyp 2 (ATCC 11733, P51); 3: Serotyp 6A (P76); 4: Serotyp 19F (P63); 5: Serotyp 2 (D39, P115); 6: Serotyp 1 (P78); 7: R6x (P139).

Die entsprechende Bande zeigte auch bei allen getesteten Serotypen eine Reaktion mit humanem Plasminogen (Abb. 22B). Diese Ergebnisse belegten die ubiquitäre Expression von Eno in jedem Pneumokokkenstamm unabhängig vom Serotyp oder von der Herkunft des Isolats. In den Blot-overlay Studien konnte gezeigt werden, dass die  $\alpha$ -Enolase in allen getesteten Serotypen Plasminogenbindungsaktivität zeigte.

### 3.5.3 Chromatographische Bestimmung der Plasminogenaktivierung durch Eno mit dem Lysin-Substratanalogon D-Val-Leu-Lys-p-Dinitroanilid

Einige Plasminogenbindungsproteine prozessieren das Zymogen in die aktive Serinprotease Plasmin. Zur Untersuchung der Funktion von Eno als Plasminogenaktivator wurde ein Proteasetest mit dem Chromophor D-Val-Leu-Lys-p-Dinitroanilid (S-2251) durchgeführt. Hierzu wurden unterschiedliche Mengen an Eno-Protein (10 ng, 100 ng, 1  $\mu$ g, 5  $\mu$ g, 10  $\mu$ g, 50  $\mu$ g) mit jeweils 6  $\mu$ g Plasminogen inkubiert. Anschließend wurde die Substratlösung mit dem Chromophor zugegeben und die serinproteolytische Spaltung des S-2251 photometrisch bei 405 nm bestimmt. Zur Feststellung der maximalen Substratumsetzung wurde in einem

Ansatz Plasmin (6 µg) zur Substratlösung gegeben. In einem Kontrollansatz wurde 6 µg Plasminogen ohne Eno mit der Substratlösung versetzt und zur Bestimmung unspezifischer Enzymaktivität die Aktivität der Substratlösung gemessen. Während die Zugabe der Serinprotease Plasmin zur Substratlösung eine photometrisch meßbare Spaltung des Chromophors bewirkte ( $1,083 \pm 0,022$  Absorption), zeigten in diesem Substratassay weder Plasminogen noch Eno eine proteolytische Aktivität (Absorptionswerte von 0,054 bzw.  $0,067 \pm 0,001$ , Abb. 23). Auch nach Präinkubation von Eno und Plasminogen erfolgt keine signifikante Prozessierung des Zymogens in das aktive Enzym Plasmin ( $0,093 \pm 0,001$  Absorption). Damit konnte gezeigt werden, dass das Eno-Protein keinen Plasminogenaktivator darstellt.



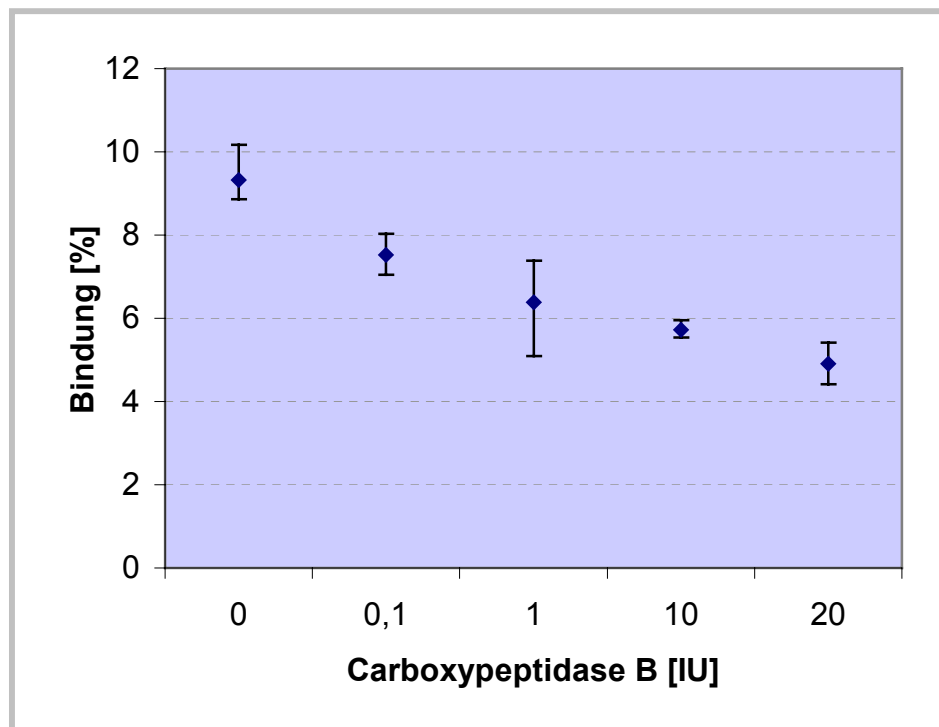
**Abbildung 23:**

Photometrische Bestimmung der Plasminogenaktivierung im Substrat-Assay mit S-2251.

### 3.6 Einfluß der carboxyterminalen Lysine der Pneumokokkenproteine auf die Bindung von humanem Plasminogen

#### 3.6.1 Plasminogenbindung nach Carboxypeptidase B-Behandlung von *Streptococcus pneumoniae*

Die zelloberflächenvermittelte Plasminogeninteraktion und die Plasminogenbindung einiger physiologisch relevanter Proteine wie z. B. dem Fibrin erfolgt über carboxyterminale Lysine (Redlitz *et al.*, 1995; Plow und Miles, 1990). Das Enzym Carboxypeptidase B ist eine Zink-Metalloprotease mit Endopeptidaseaktivität. Sie spaltet spezifisch carboxyterminale Lysine und Arginine von Proteinen.



**Abbildung 24:**

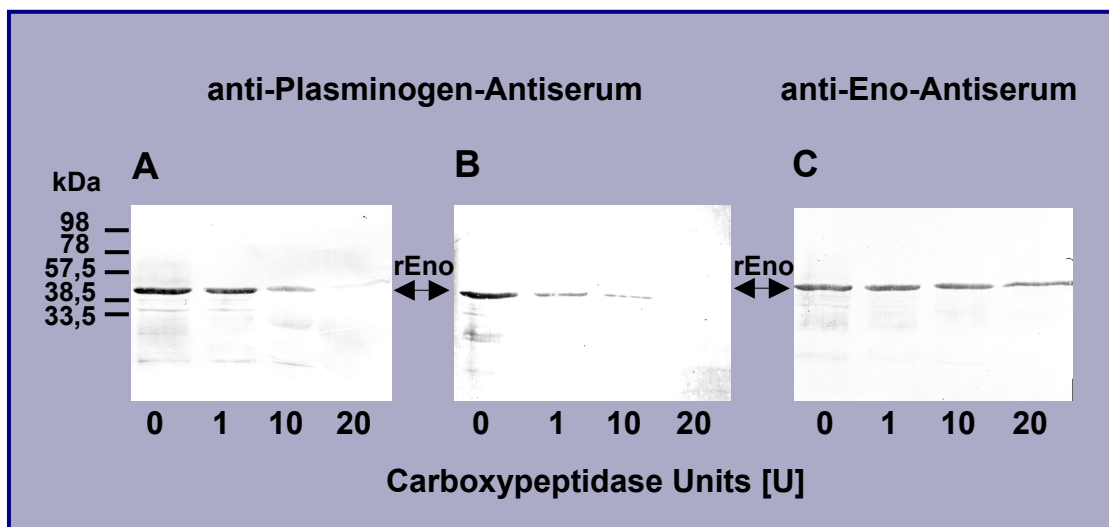
Bindung von *S. pneumoniae* R6x an radioaktiv markiertes Plasminogen nach Inkubation mit Carboxypeptidase B.

Zur Bestimmung der Funktion der carboxyterminalen Lysine für die Plasminogenbindung von Proteinkomponenten, die auf der Oberfläche der Pneumokokken lokalisiert sind, erfolgte die Inkubation von Pneumokokken mit 0,1 U, 1 U, 10 U und 20 U Carboxypeptidase B. Die enzymatisch behandelten Pneumokokken wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, Plasminogen zu binden.

Die Ergebnisse des Bindungsversuches zeigten, dass nach Carboxypeptidase-B-Behandlung eine reduzierte Plasminogenbindung an die Pneumokokken erfolgte. Mit zunehmender Konzentration an Endopeptidase nahm die Plasminogenbindungsaktivität von 9,78 % ohne Enzyminkubation auf 4,91 % Plasminogenbindung nach Inkubation mit 20 U Carboxypeptidase B (Reduktion um ~50 %) ab (Abb. 24). Die Abspaltung der carboxyterminalen Aminosäure Lysin von oberflächenlokalisierten Plasminogenrezeptoren führte zu einer signifikanten Reduktion der Plasminogenbindung und bewies die wichtige Bedeutung dieser basischen Aminosäure für die Interaktion mit dem Fibrinolyseprotein.

### **3.6.2 Untersuchungen zur Funktion der carboxyterminalen Lysine von Eno für die Plasminogenbindung**

Die Proteinsequenz der Eno von *S. pneumoniae* endet mit zwei Lysinen (Abb. 40). Zur Überprüfung der Funktion des carboxyterminalen, basischen Bereichs auf die Plasminogenbindung von Eno, wurden jeweils 5 µg des Eno-Proteins mit 0,1, 1, 10, 20 und 50 U Carboxypeptidase B bzw. mit Carboxypeptidase Y inkubiert. Die Carboxypeptidase Y ist eine Exopeptidase mit Serinproteaseaktivität am Carboxyterminus von Proteinen. Im Plasminogen-Blot-overlay wurden die enzymatisch behandelten Eno-Proteine auf Plasminogenbindungsaktivität getestet. Parallel dazu wurde ein Immunblot mit anti-Eno-Antiserum zur Detektion des Eno-Proteins durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass mit steigender Menge an Carboxypeptidase B die Plasminogenbindung durch das Eno-Protein stark reduziert wurde (Abb. 25A). Das identische Resultat konnte nach Inkubation mit Carboxypeptidase Y im Blot-Overlay gezeigt werden (Abb. 25B). Im Immunblot konnte das Eno-Protein in jedem Versuchsansatz detektiert werden. Der basische Carboxyterminus des Eno-Proteins ist demnach an der Eno-Plasminogen-Interaktion beteiligt.



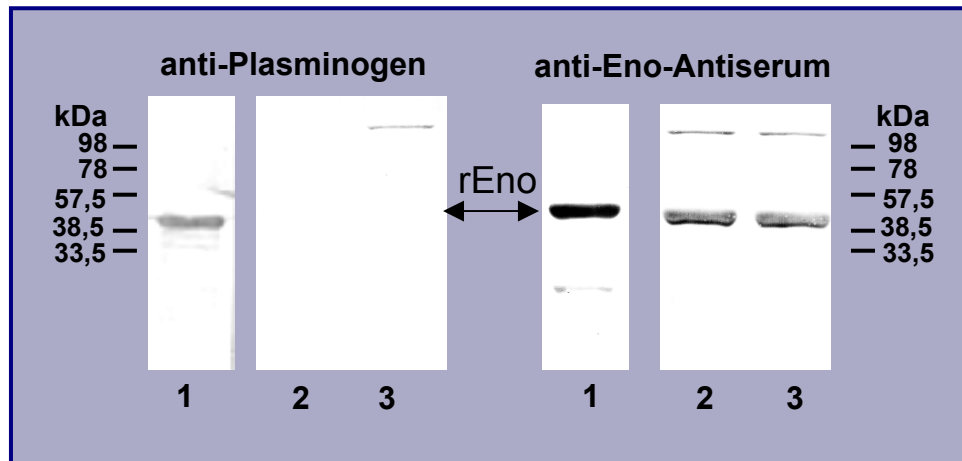
**Abbildung 25:**

Western Blot-Analyse der Plasminogenbindung von Eno nach Behandlung mit **A:** Carboxypeptidase B und **B:** mit Carboxypeptidase Y. **C:** Immunblot mit anti-Eno-Antiserum.

### 3.6.3 Analyse der Plasminogenbindung von carboxyterminal modifizierten Eno-Proteinen unter reduzierenden Bedingungen

Zur Untersuchung der Funktion der carboxyterminalen Lysine für die Plasminogenbindung erfolgte die Herstellung von modifizierten Eno-Proteinen. Durch eine gezielte Mutagenese der für Eno kodierenden Sequenz wurde ein Eno-Protein mit einer Deletion der beiden carboxyterminalen Lysine ( $\text{Eno}^{\text{del}}$ ) sowie Eno-Proteine mit Substitution des letzten Lysins zu einem Leucin an Position 434 ( $\text{Eno}^{\text{KL}}$ ) bzw. beider carboxyterminaler Lysine zu Leucinen an den Positionen 433 und 434 ( $\text{Eno}^{\text{LL}}$ ) hergestellt. Die C-terminal mutierten und damit modifizierten Eno-Proteine wurden im Vergleich zum Wildtyp-Protein auf Plasminogenbindung getestet. Die Analyse der Plasminogenbindung erfolgte im Blot-overlay mit humanem Plasminogen und anti-Plasminogen-Antikörpern. Als Kontrolle erfolgte ein Immunblot mit anti-Eno-Antikörpern. Die Entwicklung des Immunblots zeigte, dass der anti-Eno-Antikörper auch die am Carboxyterminus modifizierten Proteine detektiert. Im Blot-overlay unter reduzierenden Bedingungen zeigte ausschließlich das Wildtyp Eno-Protein eine Bindung von Plasminogen (Abb. 26). Im Gegensatz dazu konnte weder bei  $\text{Eno}^{\text{del}}$  noch bei  $\text{Eno}^{\text{LL}}$  eine Interaktion mit Plasminogen detektiert werden. Bereits der Austausch des terminalen Lysins zu einem Leucin als einzige Substitution führte zu

einem nahezu vollständigen Verlust der Plasminogenbindungsaktivität des  $\text{Eno}^{\text{KL}}$ -Proteins (Abb. 26). Dieses Ergebnis bewies die wichtige Funktion der carboxyterminalen Lysine in der Eno-Plasminogen-Interaktion.



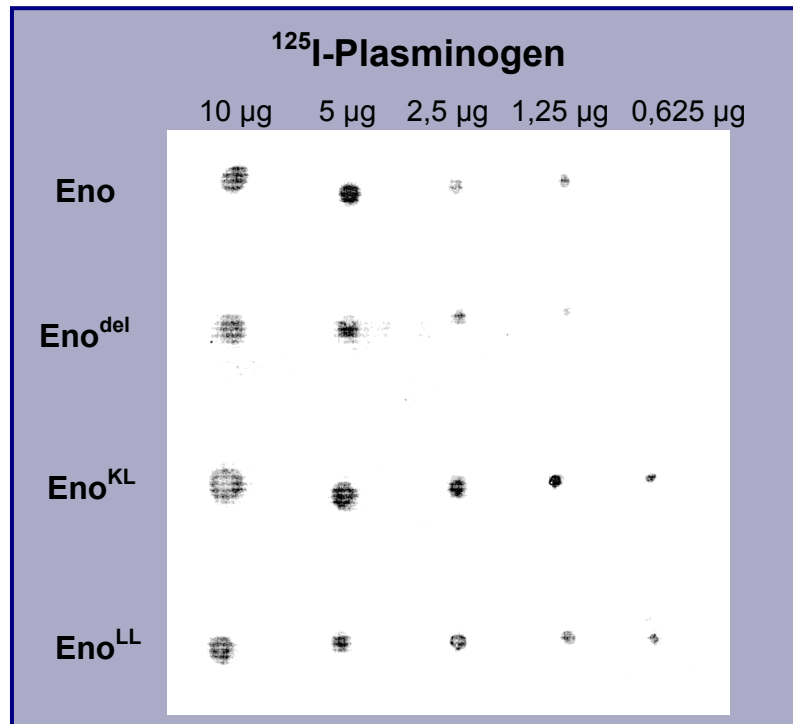
**Abbildung 26:**

Bindung der carboxyterminal modifizierten Eno-Proteine an Plasminogen und Nachweis der rekombinanten Eno-Proteine mit anti-Eno-Antiserum. 1: rEno; 2:  $\text{Eno}^{\text{KL}}$ ; 3:  $\text{Eno}^{\text{LL}}$ .

### 3.6.4 Analyse der Plasminogenbindung von carboxyterminal modifizierten Eno-Proteinen unter nativen Bedingungen

Eine Untersuchung des Bindungsverhaltens modifizierten Proteine nach der Auftrennung im Polyacrylamidgel unter nativen Bedingungen war nicht möglich, da keine Fokussierung der Proteinbanden der modifizierten Eno-Proteine erreicht werden konnte. Daher wurden die Bindungsstudien mit den unterschiedlichen Eno-Proteinen unter nativen Bedingungen im Dot-Spot durchgeführt. Hierbei wurden die modifizierten Eno-Proteine sowie das Wildtyp Protein zwischen 10  $\mu\text{g}$  und 0,625  $\mu\text{g}$  in 3  $\mu\text{l}$  Volumen punktuell auf eine Nitrozellulosemembran immobilisiert. Sowohl das Wildtyp Protein (Eno) als auch die substituierten  $\text{Eno}^{\text{KL}}$  und  $\text{Eno}^{\text{LL}}$  bzw. das deletierte  $\text{Eno}^{\text{del}}$ -Protein zeigten im Blot-overlay mit radioaktiv markiertem Plasminogen eine Plasminogenbindungsaktivität (Abb. 27). Die Abnahme der Signalintensität korrelierte mit der verringerten Proteinkonzentration in den einzelnen Spots. Die Dot-Spot-Analyse zeigte keine Unterschiede in der Interaktion von Plasminogen zwischen dem Wildtyp-Protein und den modifizierten Eno-Proteinen.





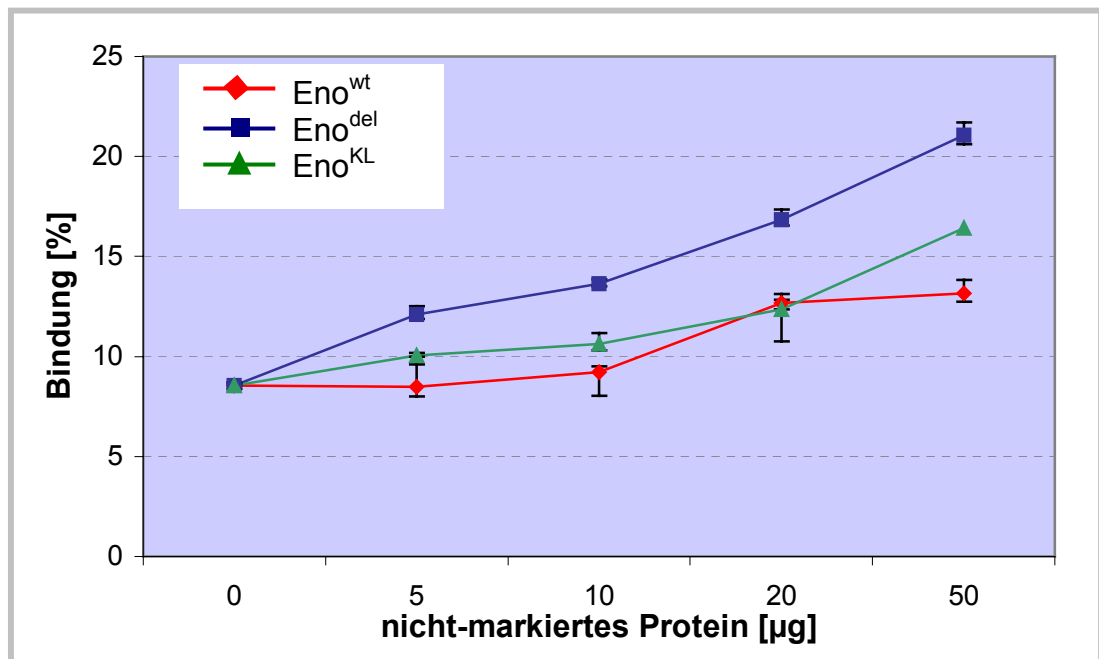
**Abbildung 27:**

Bindung von  $^{125}\text{I}$ -Plasminogen an substituierte und deletierte Eno-Proteine im Vergleich zum Wildtyp Eno-Protein im Dot-Spot-Verfahren.

### 3.6.5 Plasminogenbindung nach Reassoziaton von modifiziertem Eno-Protein an die Oberfläche von Pneumokokken

Lösliches Eno-Protein reassoziert an die Zelloberfläche von *S. pneumoniae* (Abb. 14 und 15). Diese Reassoziaton führte zu einer konzentrationsabhängigen Verstärkung der Plasminogenbindungsaktivität von Pneumokokken (Abb. 13 und 16). Im Bindungsversuch sollte untersucht werden, welchen Einfluss die modifizierten Eno-Proteine nach Reassoziaton auf die Interaktion von Pneumokokken mit radioaktiv markiertem Plasminogen zeigten. Dazu wurden die mutierten Proteine Eno<sup>KL</sup> und Eno<sup>del</sup> im Vergleich zum Wildtypprotein in den Konzentrationen 5 µg, 10 µg, 20 µg und 50 µg in Dreifachansätzen mit Bakterien des Pneumokokkenstammes R6x präinkubiert. Die Plasminogenbindungsaktivität wurde mit jeweils 60 nCi radioaktiv markiertem Plasminogen nach Inkubation mit den Eno-Proteinen untersucht. Das Eno-Wildtypprotein zeigte, wie bereits in Bindungsstudien untersucht (Abb. 13), nach Reassoziaton an die Pneumokokkenoberfläche eine Erhöhung der Plasminogenbindung um das 1,5 fache von 8,56 % ohne Präinkubation auf 13,16 % nach Inkubation mit 50 µg Eno-Protein (Abb. 28). Ergebnisse der Bindungsversuche

zeigten auch für die modifizierten Eno-Proteine ebenfalls eine Steigerung der Plasminogenbindungsaktivität um das 2,5 fache nach Inkubation mit 50  $\mu\text{g}$  Eno<sup>del</sup> bzw. 1,9 fache nach Inkubation mit Eno<sup>KL</sup> (Abb. 28). Auch in den Plasminogenbindungsanalysen nach Reassoziierung von Eno an die Oberfläche von *S. pneumoniae* zeigte die Deletion oder Substitution der carboxyterminalen Lysine des Eno-Proteins keine Auswirkung auf die Plasminogenbindungsaktivität.



**Abbildung 28:**

Plasminogenbindung von *S. pneumoniae* R6x nach Inkubation mit den Proteinen Eno, Eno<sup>del</sup> und Eno<sup>KL</sup>.

Eno zeigt 93,6 % Sequenzhomologie zur oberflächenlokalisierten Enolase SEN von *Streptococcus pyogenes* (Tab. 4). Obgleich SEN als Glykolyseenzym ubiquitär exprimiert wird, wurde für den *S. pyogenes*-Stamm A11 eine Plasminogenbindung von weniger als 5 % bestimmt. Zur Überprüfung der Plasminogenbindung des *S. pyogenes*-Stamm A11 nach Inkubation der modifizierten Eno-Proteine, wurden Bakterien diesen Stammes ebenfalls mit den unterschiedlichen Eno-Proteinen inkubiert und anschließend die Bindung von radioaktiv markiertem Plasminogen untersucht. Die Ergebnisse der Bindungsstudien zeigten, dass sowohl nach Inkubation mit dem Eno Wildtypprotein als auch mit dem carboxyterminal deletierten Protein Eno<sup>del</sup> sowie dem substituierten Eno-Protein Eno<sup>KL</sup> eine Erhöhung der Plasminogenbindungsfähigkeit erfolgte. Die Eno-Proteine konnten demnach an die

Oberfläche der *S. pyogenes*-Bakterien reassoziieren und unabhängig von den Aminosäuren des Carboxyterminus einen deutliche Anstieg der Plasminogenbindung bewirken.

### **3.6.6 Kinetikanalysen zur Interaktion zwischen Eno und Plasminogen unter Ausnutzung der Oberflächen- Plasmon-Resonanz-(SPR)Technik**

Die Technik der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) ermöglicht die Analyse der Affinität und Dynamik von Bindungsvorgängen. Das Meßprinzip beruht auf der Absorption polarisierter Lichtstrahlen, die in Abhängigkeit von Masseverhältnissen auf einer Sensorchipoberfläche in unterschiedlichen Winkeln erfolgt. Durch die Bindung von Molekülen auf der Sensorchipoberfläche wird der Absorptionsswinkel polarisierter Lichtstrahlen verändert. Die durch Bindungsereignisse hervorgerufenen Referenzunterschiede werden als gemessene Referenzeinheiten (Reference Units, RU) gegen die Zeit in Form von Sensorgrammen dargestellt. Der BIAcore-Sensor detektiert auch minimale Dichteveränderungen von Lösungen. Um diese unspezifischen Bindungssignale von den Meßwerten subtrahieren zu können, wird eine der vier Flußzellen des Sensorchips nicht mit Protein belegt und als Referenzzelle verwendet. Unter Verwendung verschiedener Proteinkonzentrationen können Bindungskinetiken erstellt werden, die eine detaillierte Auswertung der Assoziation und der Dissoziation ermöglichen. In Korrelationsanalysen werden dann die ermittelten BIAcore-Daten mit verschiedenen Bindungsmodellen algorithmisch verglichen.

Als Bindungsligand wurde das Eno-Protein auf einen Sensorchip kovalent immobilisiert. Plasminogen, sowie die Kringeldomänen 1-3 und Plasmin wurden als unterschiedliche Analyte jeweils in Lösung über die Sensorchipoberfläche geleitet. Die verwendeten Analyte zeigten in den BIAcore-Studien eine spezifische Bindung an das rekombinante Eno-Protein (*Abb. 30A-C*). In einem zweiten, unabhängigen Experiment konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Eine Bindung an die drei verwendeten Analyte konnte darüber hinaus für die carboxyterminal substituierten und deletierten Eno-Proteine in den SPR-Analysen nachgewiesen werden (*Abb. 30A-C*). In Kinetikstudien, in denen die Bindung der Analyte an die immobilisierten Eno-Proteine in ansteigenden Konzentrationen untersucht wurden, zeigten Plasminogen, Plasmin und die Kringeldomänen 1-3 eine konzentrationsabhängige

Bindung. Die Plasminkinetiken wurden nach Zusatz des Proteaseinhibitors PMSF durchgeführt, da ein Abfall der Basislinie durch eine proteolytische Spaltung des auf der Sensorchipoberfläche immobilisierten Proteins beobachtet wurde. In einem weiteren Versuchsansatz erfolgte die kovalente Immobilisierung der Kringeldomänen 1-3. Als Analyte wurden das Eno-Protein und die modifizierten Eno-Proteine Eno<sup>KL</sup>, Eno<sup>LL</sup> sowie Eno<sup>del</sup> verwendet. Die beobachteten Bindungskurven entsprachen den Resultaten des umgekehrten Versuchsansatzes.

#### **3.6.6.1 Bestimmung der Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion von Eno mit verschiedenen Analyten**

Die Auswertung der Bindungskinetiken erfolgte anhand von Bindungsmodellen, die in der Evaluierungssoftware von BIAcore enthalten waren. Zur Auswahl des geeigneten Bindungsmodells für die Bestimmung der Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten waren bereits Kenntnisse über die Interaktion erforderlich. Bei den Kinetikmodellen der BIAcore-Software handelt es sich um mathematische Algorithmen. In mehreren aufeinander folgenden Iterationen werden die berechneten theoretischen Daten an die gemessenen Daten einer Bindungskinetik (mit Angabe der verwendeten Proteinkonzentrationen) gemäß den Vorgaben des Bindungsmodells angeglichen. Die zur Verfügung stehenden Bindungsmodelle sind in Abbildung 29 dargestellt.

Zur Auswahl des geeigneten Bindungsmodells wurden zunächst die Ergebnisse der vorherigen Bindungsanalysen gegenübergestellt. Bei einem Vergleich der Plasminogenbindung an die carboxyterminal modifizierten Eno-Proteine unter nativen Bedingungen im Dot-Spot-Verfahren konnte kein signifikanter Unterschied in der Bindung von radioaktiv markiertem Plasminogen festgestellt werden (Abb. 27). Darüber hinaus zeigten die Eno-Proteine mit einer Deletion bzw. Aminosäuresubstitution nach Reassoziierung an die Oberfläche von *S. pneumoniae* auch eine konzentrationsabhängige Verstärkung der Plasminogenbindungseigenschaft, so wie sie für das Eno Wildtypprotein gezeigt wurde (Abb. 28). Diese Ergebnisse deuteten an, dass es sich bei der Interaktion der unterschiedlichen Eno-Proteine mit Plasminogen nicht um eine einfache 1:1-Langmuir Bindung handelte, sondern dass mehr als eine Bindungsstelle im immobilisierten Eno-Protein an der

Plasminogenbindung beteiligt ist. Daher wurde das heterogene Liganden-Bindungsmodell für die Bestimmung der Kinetikparameter dieser Interaktion angewendet. Hierbei erfolgte eine simultane Evaluierung der Assoziations- und Dissoziationsphase (*Abb. 30A*).

- $A + B \rightleftharpoons AB$ : **1:1 Langmuir Bindung**

Dieses Modell beschreibt die Bindung des Analyten mit einer Bindungsstelle an eine Bindungsstelle im immobilisierten Liganden.

- $A + B1 \rightleftharpoons AB1$ ;  $A + B2 \rightleftharpoons AB2$ : **Heterogener Ligand, parallele Reaktionen**

Hier bindet der Ligand mit zwei Bindungsstellen in zwei unabhängigen Bindungsereignissen an eine Bindungsstelle des Analyten.

- $A + B \rightleftharpoons AB$ ;  $AB + B \rightleftharpoons AB2$ : **Bivalentes Bindungsmodell**

Zwei Bindungsstellen im Analyten binden an eine Bindungsstelle des monovalenten Liganden.

- $A + B \rightleftharpoons AB$ ;  $AB \rightleftharpoons A^*B$ : **Zwei-Phasen-Reaktion**

Dieses Modell berücksichtigt eine Konformationsänderung, die nach der Komplexbildung stattfindet, und die Dissoziation beeinflusst.

**Abbildung 29:** Kinetikmodelle der BIAevaluation-Software

Die Güte einer Kinetikanalyse wurde anhand der optischen Übereinstimmung der theoretisch ermittelten Bindungskurven mit den Sensorgramm Daten des Versuchs ermittelt. Die Abweichungen wurden als "Residual plot" graphisch dargestellt (*Abb. 30B*). Der Kurven/Graphenverlauf der Ableitungsfunktion  $[\ln dRU / dt]$  war eine weitere Hilfsfunktion zur Bewertung der Kinetikanalyse. Des weiteren ermöglichte die Bestimmung der Flächensummenabweichung " $\chi^2$ " eine quantitative Abschätzung der Übereinstimmung der gemessenen Bindungsdaten mit den errechneten Werten des angewandten Kinetikmodells. Niedrige " $\chi^2$ "-Werte, geringe Abweichungen im "Residual Plot" und ein linearerer Verlauf der Ableitungsfunktion waren Hinweise für eine gute Übereinstimmung des gewählten heterogenen Liganden-Bindungsmodells mit den tatsächlich gemessenen Interaktionen von humanem Plasminogen mit rEno (*Abb. 29 A-C*). Die Analyse der Bindung von Plasminogen an die modifizierten Eno-Proteine Eno<sup>del</sup>, Eno<sup>LL</sup> und Eno<sup>KL</sup> zeigte ebenfalls nur geringe Abweichungen im "Residual plot". Die in Tabelle 1 dargestellten " $\chi^2$ " -Werte zeigten, dass die

Evaluierung der Interaktionen mit Plasmin durch das heterogene Modell keine Annäherung an die tatsächliche Bindungsdynamik darstellte. Im Gegensatz dazu bestätigten relativ kleine Standardabweichungen für die Analyse der Kringel1-3-Bindung an die carboxyterminal modifizierten Proteine Eno<sup>LL</sup> und Eno<sup>del</sup> die Wahl des heterogenen Bindungsmodells für die Auswertung der Plasminogen-Eno-Interaktionen (Tab. 1).

Die Datenanalyse anhand des heterogenen Modells hat sich als beste Annäherung der tatsächlichen Interaktion von Eno und Plasminogen herausgestellt, obgleich die simultane Evaluierung der Kinetikparameter mit keinem der in der Software vorhandenen Modelle zu einer völligen Übereinstimmung der integrierten Kurvenverläufe mit den gemessenen Daten führte. Die Anwendung des heterogenen Modells ermöglichte daher die Angabe von Näherungswerten für die Gleichgewichtskonstanten (Tab. 1). Für die Interaktion zwischen Eno und Plasminogen wurden zwei Dissoziationskonstanten bestimmt:  $K_{D1}$ : 0,55 nM und  $K_{D2}$ : 86,2 nM.

Bindungspartner	$k_{a1}$ [1/M s] ( $\times 10^4$ )	$k_{a2}$ [1/M s] ( $\times 10^4$ )	$k_{d1}$ [1/s] ( $\times 10^{-4}$ )	$k_{d2}$ [1/s] ( $\times 10^{-4}$ )	$K_{D1}$ [M] ( $\times 10^{-9}$ )	$K_{D2}$ [M] ( $\times 10^{-9}$ )	$\chi^2$
Eno-Kringel1-3	2,08	17,5	1,61	9,84	7,75	5,62	28,1
Eno-Plasminogen	0,87	15,5	0,005	133	0,55	86,2	21,3
Eno-Plasmin	38,6	5,92	82,3	0,004	0,21	6900	305
Eno <sup>KL</sup> -Kringel 1-3	1,83	19,0	0,93	19,5	0,51	0,1	5,47
Eno <sup>KL</sup> -Plasminogen	1,06	13,0	0,002	142	230	0,01	3,38
Eno <sup>KL</sup> -Plasmin	28,5	8,2	210	0,023	0,74	2700	61
Eno <sup>LL</sup> -Kringel 1-3	1,28	13,4	4,24	7,92	0,33	5,92	9,94
Eno <sup>LL</sup> -Plasminogen	6,09	6,02	0,48	0,47	78,7	78,1	23
Eno <sup>LL</sup> -Plasmin	30,8	5,88	100	0,009	0,33	155	174
Eno <sup>del</sup> -Kringel1-3	13,9	1,2	0,13	5,74	9,09	0,47	7,7
Eno <sup>del</sup> -Plasminogen	5,04	5,09	4,97	5,04	99	99	37,3
Eno <sup>del</sup> -Plasmin	8,92	32,0	0,03	182	29	0,57	263

**Tabelle 1:**

Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{a1}$ ,  $k_{a2}$ ,  $k_{d1}$ ,  $k_{d2}$  und der Gleichgewichtskonstanten  $K_{D1}$ ,  $K_{D2}$  aus der simultanen Kinetikevaluierung nach dem heterogenen Bindungsmodell.

### 3.6.6.2 Bestimmung der Kinetikparameter nach separaten Reaktionsmodellen

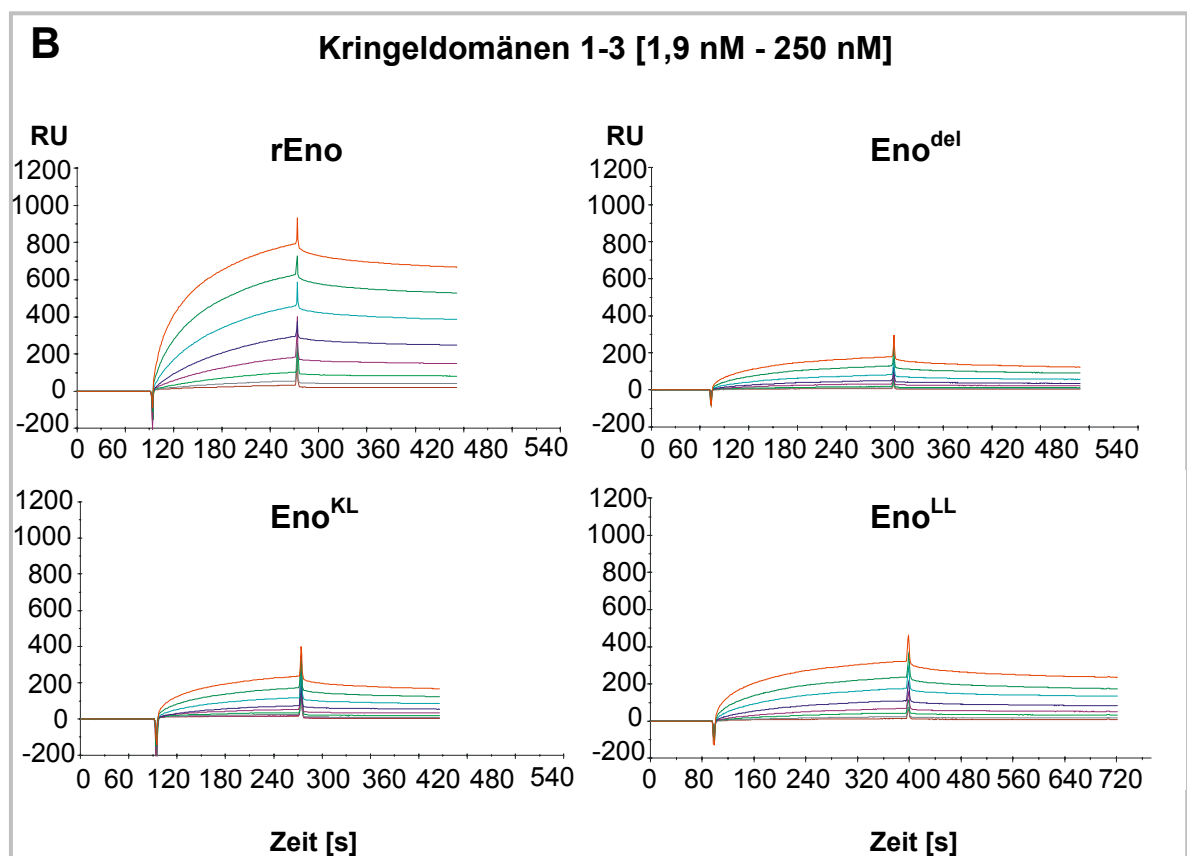
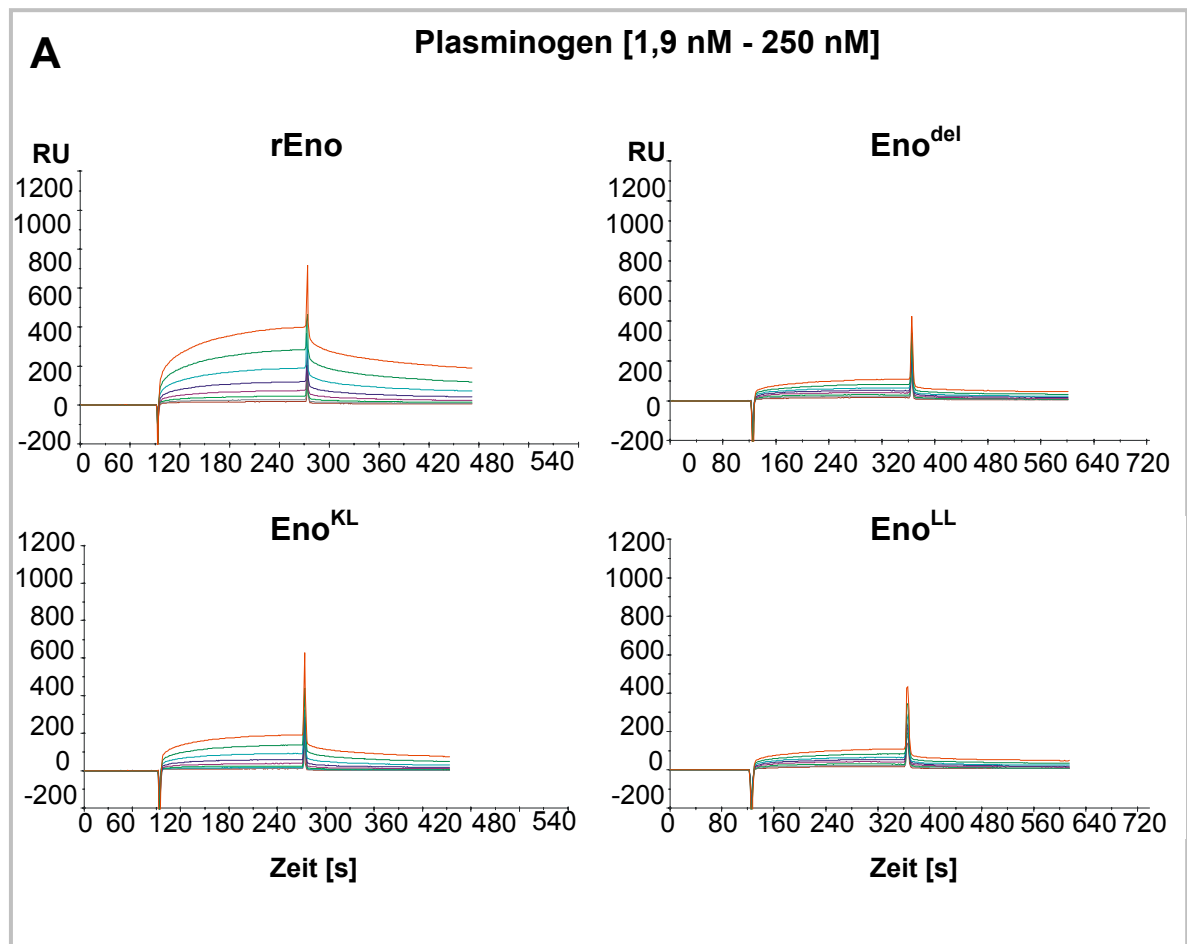
Zur genaueren Bestimmung der dynamischen Bindungsparameter erfolgte eine separate Analyse der Dissoziationsphasen. Zur separaten Auswertung des Dissoziationsverhaltens wurde ein Interaktionsmodell angewandt, das das Vorkommen mehrerer Bindungsstellen berücksichtigt und bereits zur Auswertung der Interaktion von Plasminogen mit der humanen  $\alpha$ -Enolase (Andronicos *et al.*, 2000) formuliert wurde.

Bindungspartner	$k_{d1}$ [1/s] ( $\times 10^{-3}$ )	$k_{d2}$ [1/s] ( $\times 10^{-3}$ )	$\chi^2$
Eno-Kringel1-3	3,6	1,28	9
Eno-Plasminogen	2,74	2,7	13
Eno-Plasmin	2,92	0,5	9
Eno <sup>KL</sup> -Kringel 1-3	2,8	1,25	2
Eno <sup>KL</sup> -Plasminogen	7,6	3,55	3
Eno <sup>KL</sup> -Plasmin	4,79	0,8	7
Eno <sup>LL</sup> -Kringel 1-3	1,0	0,59	1
Eno <sup>LL</sup> -Plasminogen	8,1	2,51	1
Eno <sup>LL</sup> -Plasmin	3	0,5	7
Eno <sup>del</sup> -Kringel1-3	8,52	1,0	2
Eno <sup>del</sup> -Plasminogen	9,6	2,65	1
Eno <sup>del</sup> -Plasmin	3,14	0,5	2

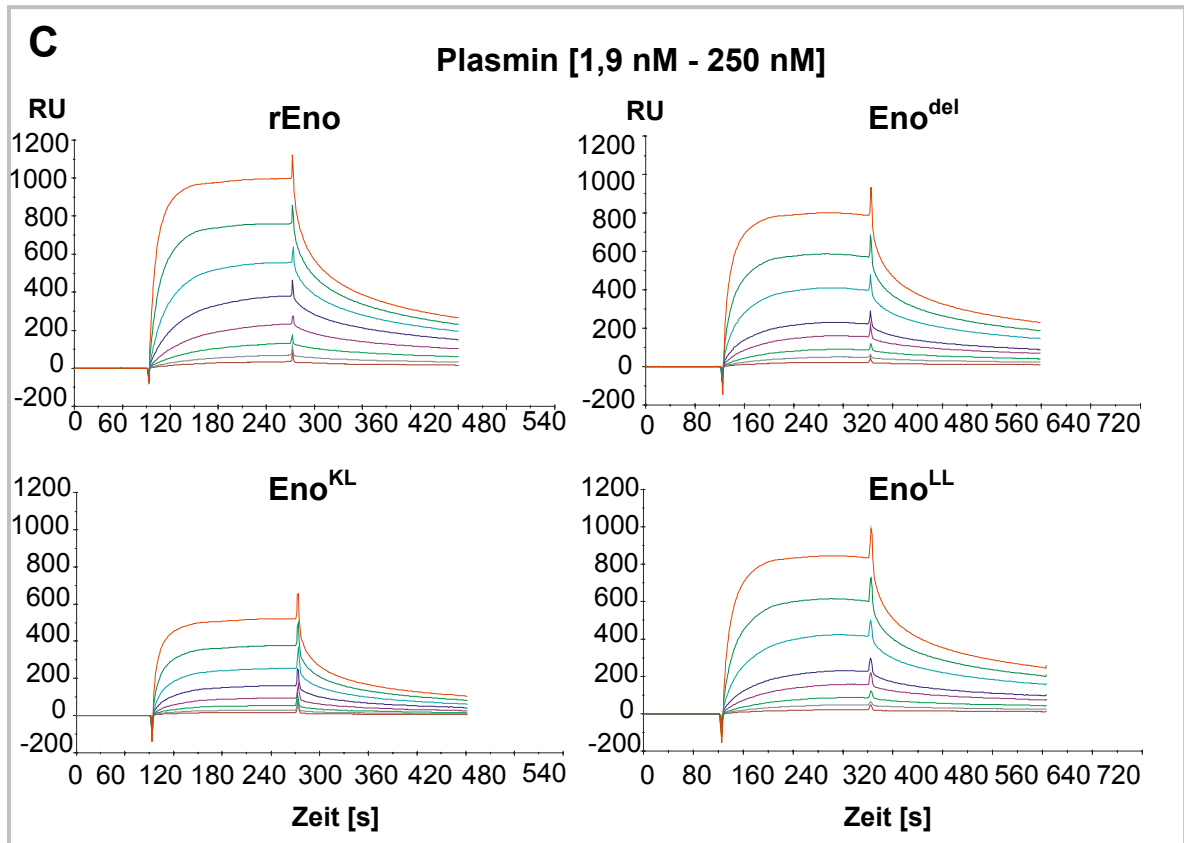
**Tabelle 2:**

Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{d1}$  bzw.  $k_{d2}$ , die aus der separaten Kinetikanalyse der Dissoziationsphase nach dem 1:1-Bindungsmodell mit Berücksichtigung mehrerer Bindungsstellen (Andronicos *et al.*, 2000) ermittelt worden sind.

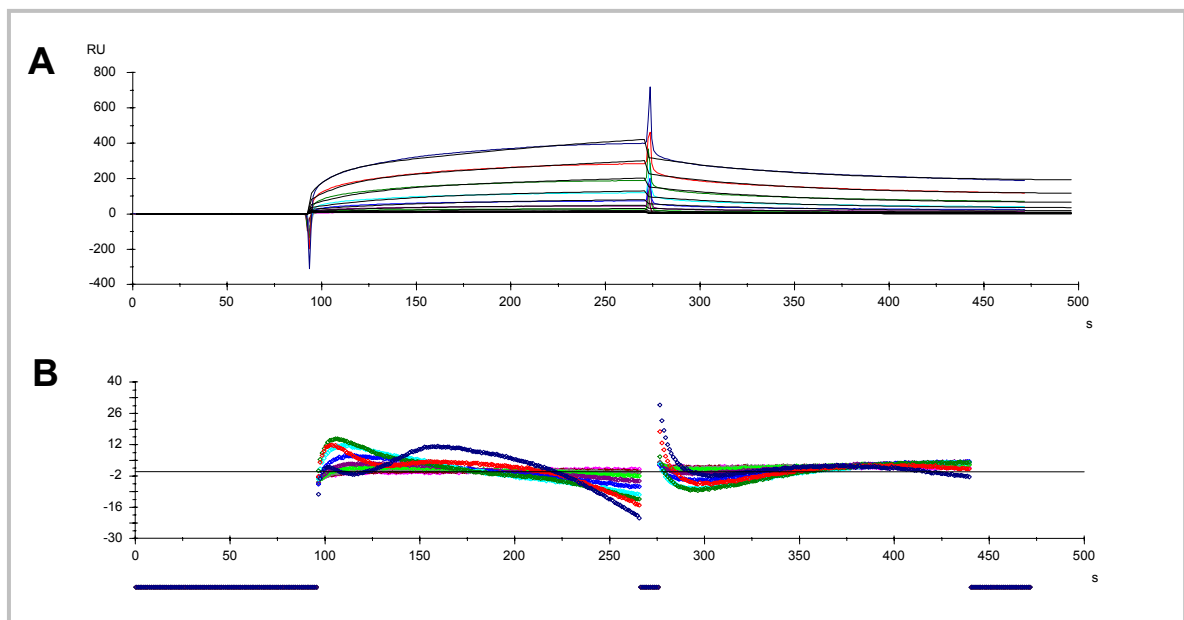
Dieses Modell beschreibt Bindungsereignisse mit zwei verschiedenen Dissoziationsgeschwindigkeiten, die durch Konformationsänderungen oder durch Interaktion mit mehr als einer Bindungsstelle im Liganden auftreten. Die nach diesem Modell ermittelten Daten für die Dissoziationsgeschwindigkeiten sind mit  $2,74 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  für  $k_{d1}$  und  $2,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  für  $k_{d2}$  für die Eno-Plasminogen-Interaktion nahezu identisch. Während die Werte der Dissoziationsgeschwindigkeiten  $k_{d2}$  der carboxyterminal modifizierten Eno-Proteine und Plasminogen in der gleichen Größenordnung liegen, sind die  $k_{d1}$ -Werte um den Faktor 2,8 für Eno<sup>KL</sup> bzw. den Faktor 3 für Eno<sup>LL</sup> sowie 3,5 für Eno<sup>del</sup> größer (Tab. 2).





**Abbildung 30:**

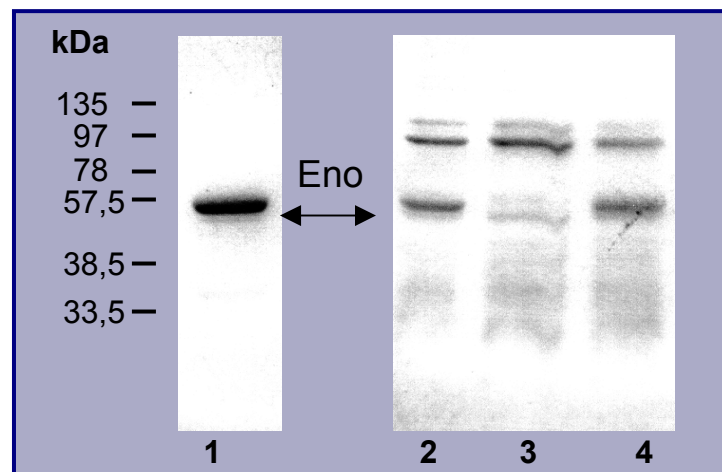
Sensorgramme der Bindungskinetiken von rEno,  $\text{Eno}^{\text{del}}$ ,  $\text{Eno}^{\text{KL}}$  und  $\text{Eno}^{\text{LL}}$  als immobilisierte Liganden mit Plasminogen (A), Kringel 1-3 (B) und Plasmin (C) als Analyte. Dargestellt sind Änderungen des Absorptionswinkels als Resonanzunits [RU] gegen die Zeit [s].

**Abbildung 31:**

(A): Kinetikanalyse der Eno-Plasminogen-Interaktion nach dem heterogenen Modell mit 1,9 nM -500 nM Plasminogen. Die schwarzen Bindungskurven des heterogenen Bindungsmodells wurden in mehreren Iterationen an die gemessenen Kurven (farbig dargestellt) angeglichen. (B): Abweichungen der theoretischen Evaluierung von dem tatsächlichen Bindungsverlauf werden im "Residual -Plot" dargestellt.

### 3.6.7 Bindung von Plasminogen an *eno*-Mutanten von *Streptococcus pneumoniae*

Zunächst wurde versucht, durch homologe Rekombination eine Mutante von *S. pneumoniae* herzustellen, die durch Insertion einer Antibiotika-Kassette in das *eno*-Gen kein Enolase-Protein exprimieren sollte. Zur Komplementation der fehlenden Enolaseaktivität wurde das Produkt Phosphoenolpyruvat in unterschiedlichen Mengen zum Kulturmedium gegeben. Es war mit dieser Methode nicht möglich, lebensfähige Transformanden zu erhalten. Daher wurde zur Herstellung einer definierten *eno*-Mutante von Pneumokokken eine Insertions-Duplikations-Mutagenese durchgeführt. Durch nicht-reziproke integrative Rekombination wurde der carboxyterminale Bereich des *eno*-Gens durch das mutierte *eno*-Gen ersetzt. Der zur Mutagenese verwendete Vektor pJDC9 inserierte in gesamter Länge in das Genom und verhinderte so eine Expression des ursprünglichen *eno*-Gens. Mit dieser Methode wurden Mutanten vom *S. pneumoniae*-Stamm R6x hergestellt, die entweder das Wildtyp-Enoprotein (pJDC9::*eno*<sup>wt</sup>) exprimierten oder aber eine Enolase, dessen carboxyterminale Lysine durch Positions-spezifische Mutagenese deletiert worden waren (pJDC9::*eno*<sup>del</sup>).

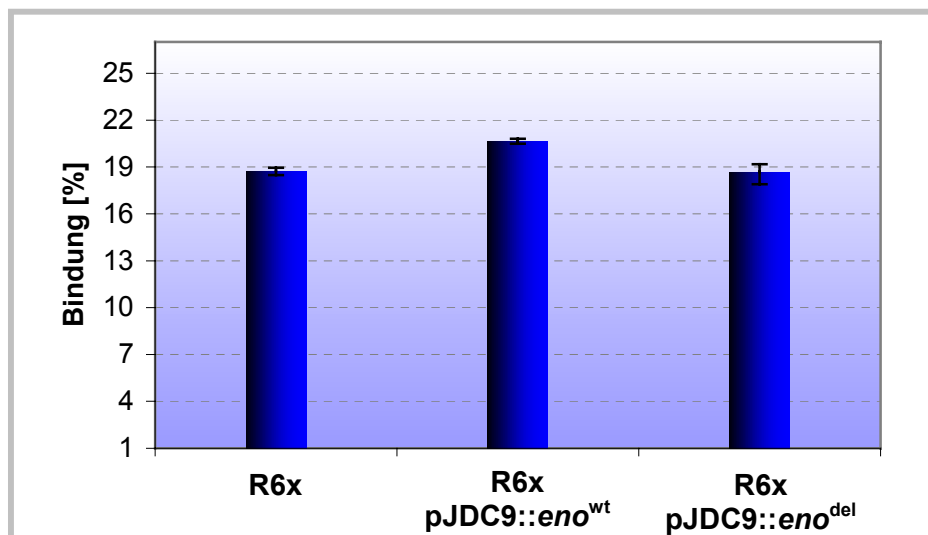


**Abbildung 32:**

Western-blot-Analyse der *eno*-Mutantenstämme mit radioaktiv markiertem Plasminogen. **1:** rEno; **2:** Lysat von *S. pneumoniae* R6x (P139, unbekapselt); **3:** Lysat der Pneumokokkenmutante R6x pJDC9::*eno*<sup>del</sup>; **4:** Lysat der Pneumokokkenmutante R6x pJDC9::*eno*<sup>wt</sup>.

Die korrekte Insertion wurde durch PCR-Amplifikation und Southern Blot-Analyse bestätigt. Die Expression des Eno-Proteins wurde im Immunblot überprüft und die

Bindung von humanem Plasminogen unter reduzierenden Bedingungen untersucht. Die Plasminogenbindung konnte für das 47 kDa Protein des Wildtyp-Stammes und ebenso groß im Lysat der Pneumokokkenmutante pJDC9::*eno*<sup>wt</sup> nachgewiesen werden (Abb. 32). Das Ergebnis des Immunblots zeigte, dass es sich hierbei um die Bande des Eno-Proteins handelte. Im Gegensatz dazu konnte unter reduzierenden Bedingungen keine Plasminogenbindung an das im Immunblot identifizierte Eno-Protein der Pneumokokkenmutante R6x pJDC9::*eno*<sup>del</sup> detektiert werden (Abb. 32). Zur Untersuchung der Plasminogenbindung an die unterschiedlichen Pneumokokkenmutanten, wurden Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem Plasminogen durchgeführt. Im Bindungsversuch zeigte der Wildtyp *S. pneumoniae* R6x 18,76 % Bindung (Abb. 33). Für die Pneumokokkenmutante R6x pJDC9::*eno*<sup>wt</sup> wurde eine Plasminogenbindung von 20,68 % gezeigt.



**Abbildung 33:**

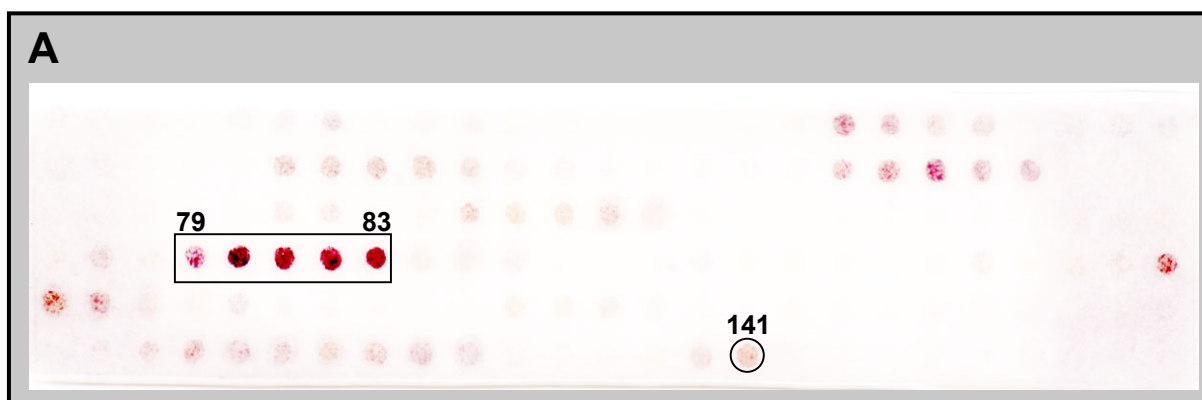
Bindung von <sup>125</sup>I-Plasminogen an Pneumokokkenmutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Die Plasminogenbindungsaktivität der Pneumokokkenmutante R6x pJDC9::*eno*<sup>del</sup>, die das carboxyterminal deletierte Eno-Protein exprimiert, war nahezu identisch mit 18,69 % der Bindungsaktivität des Wildtypstammes (Abb. 33). Die Ergebnisse des Bindungsversuchs zeigten keinen signifikanten Unterschied der Bindung von Plasminogen an die *eno*-Mutanten von *S. pneumoniae* im Vergleich zum Wildtyp-Stamm.

### 3.7 Identifikation des internen Plasminogenbindungsmotivs in Eno

#### 3.7.1 Spot-Membran Analyse der Plasminogenbindung von Eno mit synthetischen Peptiden

Zur Identifikation von Bindungsmotiven für Plasminogen im Eno-Protein wurde die Eno-Sequenz in 141 synthetische Peptide mit einer Länge von jeweils 15 Aminosäuren aufgeteilt. Die Sequenz der Peptide überlappte in einem Bereich von 12 Aminosäuren mit dem jeweils darauffolgenden Peptid. Die synthetisierten Peptide wurden in der Reihenfolge der Enosequenz als Peptidspots auf Nitrozellulosemembran immobilisiert und die Membran mit humanem Plasminogen inkubiert. Die Detektion der Plasminogenbindung erfolgte mit anti-Plasminogen-Antikörpern und Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper.



<b>B</b>	<b>Bindung</b>
Peptid 78: <sup>231</sup> VP GKDVFIGFDCASS <sup>246</sup>	-
Peptid 79: <sup>234</sup> KDVFIGFDCASS <b>EFY</b> <sup>249</sup>	+
Peptid 80: <sup>37</sup> FIGFDCASS <b>EFYDKE</b> <sup>252</sup>	+
Peptid 81: <sup>240</sup> FDCASS <b>EFYDKERKV</b> <sup>255</sup>	+
Peptid 82: <sup>243</sup> ASS <b>EFYDKERKVYDY</b> <sup>258</sup>	+
Peptid 83: <sup>246</sup> <b>EFYDKERKVYDYTKF</b> <sup>261</sup>	+
Peptid 84: <sup>249</sup> DKERKVYDYTKFE <b>GE</b> <sup>263</sup>	-

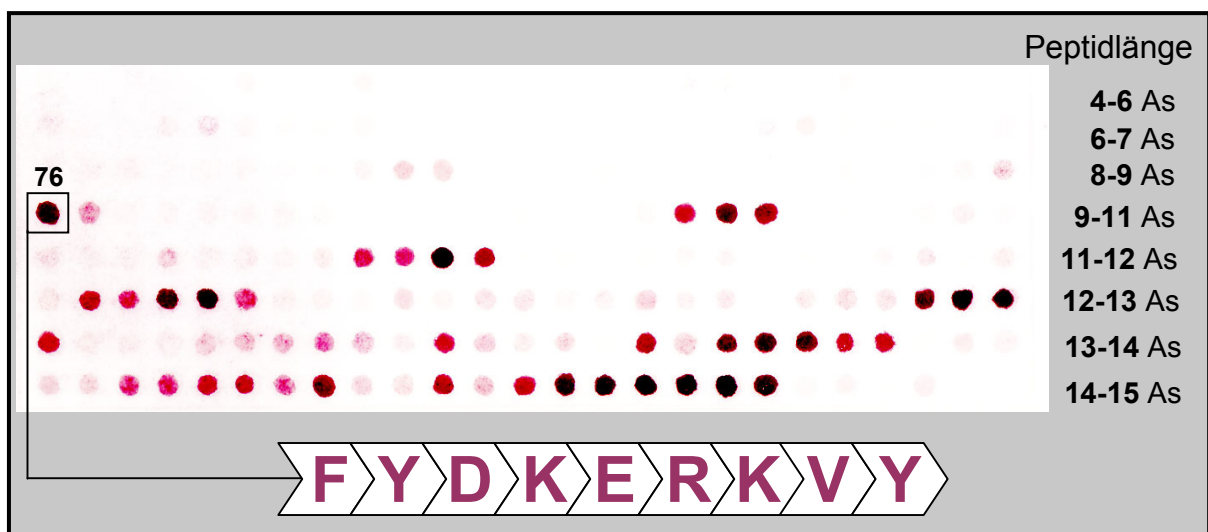
#### **Abbildung 34:**

**A:** Spot Membran der 141 synthetischen Peptide der gesamten Eno-Proteinsequenz nach Inkubation mit Plasminogen und anti-Plasminogen Antikörpern. Der Rahmen um die Peptide 79 bis 83 markiert die Peptide mit starkem Plasminogenbindungssignal. Bei Peptid 141 handelt es sich um das Peptid mit den carboxyterminalen Lysinen. **B:** Sequenzen der synthetischen Peptide mit positiver Plasminogenbindung (+).

In Vorversuchen wurden unspezifische Hintergrundreaktionen mit dem Zweitantikörper bzw. mit beiden Antikörpern bestimmt. Das Ergebnis der Bindungsanalysen zeigte, dass 5 der gekoppelten synthetischen Peptide aus dem internen Bereich der Eno-Proteinsequenz mit Plasminogen reagierten (Abb. 35). Die Peptide repräsentierten die Aminosäuren 237 bis 263. Das letzte Peptid der Spot-Membran enthielt die beiden carboxyterminalen Lysine und zeigte ebenfalls eine Reaktion mit Plasminogen, die jedoch im Vergleich zur Bindungsreaktion im internen Bereich deutlich schwächer war. Die Analyse der Plasminogenbindung von synthetischen Peptiden ermöglichte die Identifikation eines zweiten Bindungsmotifs im internen Bereich von Eno für die Plasminogenbindung.

### 3.7.2 Identifikation des minimalen Epitops für die Plasminogenbindung im internen Bindungsmotiv von Eno

Zur Eingrenzung der für die Plasminogenbindung erforderlichen Aminosäuren im internen Bindungsmotiv, wurde eine weitere Spot-Membran angefertigt. Als Grundlage für die Peptidsynthese diente das in der ersten Membran nachgewiesene Bindungsmotiv zwischen den Aminosäuren 232 und 267. Die Länge der 198 synthetisierten Peptide variierte zwischen 4 und 15 Aminosäuren.



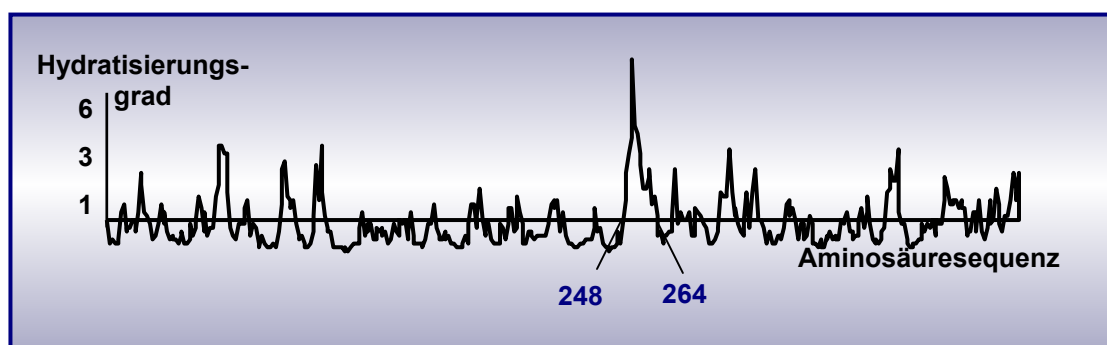
**Abbildung 35:**

Eingrenzung des Plasminogenbindungsmotivs durch synthetische Peptide der Bindungsregion mit einer Länge von 4 bis 15 Aminosäuren. Der umrahmte Bereich markiert das kleinste synthetische Peptid mit Plasminogenbindungsaktivität.

Die Aminosäureabfolge wurde bei jedem nächstfolgenden Peptid um eine Aminosäure versetzt. Die Membran wurde für einen Plasminogenbindungsversuch mit anti-Plasminogen Antikörpern eingesetzt. Das synthetische Peptid an Position 76 konnte als minimalste Aminosäureabfolge mit eindeutiger Plasminogenbindung identifiziert werden (Abb. 35). Damit wurde das essentielle Bindungsmotiv auf die Aminosäureabfolge 'FYDKERKVY' eingegrenzt.

### 3.7.3 Computerunterstützte Analyse zur Oberflächenlokalisierung der internen Bindungssequenz im Eno-Molekül

Die graphische Darstellung des Hydratisierungsgrades einzelner Aminosäuren ermöglichte eine theoretische Abschätzung der Wahrscheinlichkeit der Lokalisation einzelner Aminosäurebereiche an der Oberfläche von Proteinen (Janin und Wodak, 1978; Emini *et al.*, 1985). Das Ergebnis dieser computerunterstützten Analyse zeigte die höchste Wahrscheinlichkeit einer Exposition an der bakteriellen Oberfläche für den Aminosäurebereich zwischen Phe 248 und Gly 263 (Abb. 36). Das durch Spot Membran-Analyse ermittelte interne Bindungsmotiv befand sich zwischen den Aminosäuren Phe 248 und Tyr 256 des Eno-Proteins und damit innerhalb der Region mit größter Wahrscheinlichkeit einer Oberflächenexposition. Dieses Ergebnis gab einen ersten Hinweis darauf, dass das Bindungsmotiv exponiert am Eno-Molekül vorliegt und damit auch zugänglich ist für das Plasminogen der umgebenden Matrix.

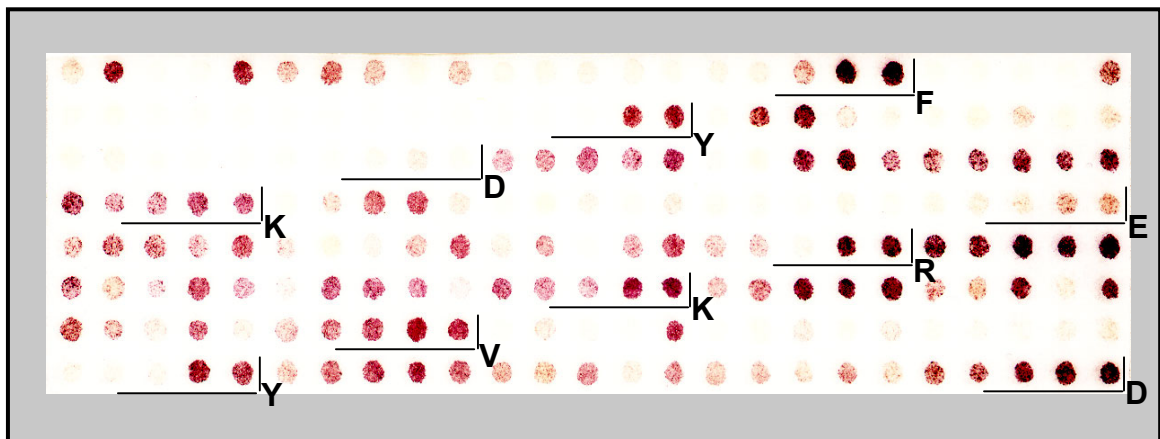


**Abbildung 36:**

Wahrscheinlichkeit einer Oberflächenexposition der Aminosäuren des Eno-Proteins (Janin und Wodak, 1978 und Emini *et al.*, 1985).

### 3.7.4 Mutationsanalyse der für die Plasminogenbindung essentiellen Aminosäuren

Zur Identifikation der für die Plasminogenbindung kritischen Aminosäuren wurde eine systematische Mutagenese durch punktuelle Aminosäureaustausche durchgeführt. Hierzu wurden Peptide analog der Sequenzabfolge des Bindungsmotivs FYDKERKVYD synthetisch hergestellt, wobei die Aminosäure an jeder einzelnen Sequenzposition systematisch durch jeweils eine der 20 möglichen Aminosäuren substituiert wurde.



**Abbildung 37:**

Analyse der Plasminogenbindung an kovalent immobilisierte, synthetische Peptide des internen Bindungsmotifs nach systematischer Aminosäuresubstitution. Die Buchstaben markieren die substituierte Aminosäure im Bindungsmotiv 'FYDKERKVYD'.

Nach Immobilisierung der synthetischen Peptide auf der Membran wurde die Plasminogenbindung der Peptide an Plasminogen untersucht. Die Spot-Membran-Analyse zeigte, dass besonders die polare aromatische Aminosäure Tyrosin an den Positionen 2 und 9 im Bindungsmotiv, sowie die negativ geladenen Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure an den Positionen 3 und 5 wichtig für die Plasminogenbindung sind (Abb. 37, Tab. 3). Jede nicht-konservative Aminosäure-Substitution an einer dieser Positionen bewirkte einen vollständigen Verlust der Plasminogenbindungsaktivität (Tab. 3).

	F(Phe)	Y(Tyr)	D(Asp)	K(Lys)	E(Glu)	R(Arg)	K(Lys)	V(Val)	Y(Tyr)	D(Asp)
A	+	-	-	+	-	+	+++	+	-	++
C	++	-	++	+	+	+	+++	+	+	+
D	-	-	+++	+	++	+	+++	++	-	++
E	-	-	-	+	++	+	+++	++	-	++
F	++	+	-	++	+	+	+++	++	++	+
G	+	-	-	-	-	-	++	+	-	+
H	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+
I	+	-	-	++	-	-	+	++	+	+
K	-	-	-	++	-	-	++	-	-	-
L	+	-	-	++	-	+	++	++	+	++
M	-	-	-	++	-	-	+	++	-	+
N	-	-	-	++	-	+	++	+	-	+
P	-	-	-	++	-	-	++	-	-	-
Q	-	-	-	++	-	++	++	++	-	+
R	-	-	-	++	-	++	+	-	-	-
S	-	-	-	++	-	+	++	+	-	+
T	-	-	-	++	-	+	++	+	-	+
V	+	-	-	++	-	-	+	++	-	+
W	++	++	+	++	+	+++	+++	+++	++	++
Y	+++	++	-	++	+	+++	+++	+++	++	+++

**Tabelle 3:**

Auswertung der systematischen Aminosäuresubstitution an den einzelnen Positionen im internen Plasminogenbindungsmotiv. (-): keine Reaktion des Peptids, (+): schwache Reaktion, (++) : starke Reaktion, (+++) : sehr starke Reaktion. Die Intensität der farblichen Unterlegung verdeutlicht die Unterschiede in der Reaktionsstärke.

### 3.7.5 Sequenzvergleich der Enolasen verschiedener Organismen

Ein Homologievergleich der Enolase-Proteinsequenzen von *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus intermedius* zeigte eine Identität von 90 % (Tab. 4). Die Analyse der internen Plasminogenbindungssequenz 'FYDKERKVYD' mit Hilfe des TBLASTN-Suchmodus in den Datenbanken von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) zeigte eine 100 %ige Übereinstimmung dieser Aminosäureabfolge in den Enolasesequenzen der genannten *Streptococcus*-Arten. Die Sequenz der Enolase von *S. pneumoniae* zeigte ebenfalls über 70 %-Homologie zur Enolase anderer Gram-positiver Mikroorganismen wie *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis* (Tab. 4). Im Bereich



des internen Bindungsmotivs wurden jedoch Abweichungen in der Aminosäuresequenz festgestellt. So zeigte die Aminosäuresequenz des internen Bindungsmotivs 'FYDKERKVY' von *S. pneumoniae* an der dritten Position ein Aspartat und an Position 5 ein Glutamat. Während bei *S. aureus* das Aspartat durch Glutamat konservativ substituiert war, fehlten die Aminosäuren Glutamat und das darauffolgende Arginin. Die Sequenzhomologien von Eno zu Enolasen Gram-negativer Mikroorganismen wie *Neisseria meningitidis* und *Escherichia coli* lagen zwischen 55 % und 60 % (Tab. 4).

Organismus	Homologie [%]	Internes Bindungsmotiv	Carboxyl-Terminus
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Ac.: AJ303085	100	..SSEFYDKERKVYDYTK..	...KSFYNLKK
<i>Streptococcus pyogenes</i> Ac.: P82479	93,6	..SSEFYDKERKVYDYTK..	...KSFYNLKK
<i>Streptococcus intermedius</i> Ac.: BAA 81815	91,0	..SSEFYDKERKVYDYTK..	...KSFYNLSK
<i>Staphylococcus aureus</i> Ac.: P373986	76,9	..SSEFYENG--VYDVSK--	...KSFYNLDK
<i>Bacillus subtilis</i> Ac.: P391270	71,3	..SSEFYNKEDGKYNLS--	..NSFYNLNK
<i>Listeria monocytogenes</i> Ac.: P465978	71,1	..ASEFYNRETGKYELKG..	..DTFYNLKK
<i>Borrelia burgdorferi</i> Ac.: P212471	61,0	..TSELYDPKTKKYVL-K..	..VFYSIKQK
<i>Neisseria meningitidis</i> Ac.: P284217	59,7	..SSEFYK--DGKYNLE--	..AAFYQLGK
<i>Yersinia pestis</i> Ac.: P406838	58,9	..ASEFYKDGKYVLAGRG..	..GLKEVKGQ
<i>Escherichia coli</i> Ac.: P417259	55,8	..ASEFY-K-DGKYVLA--	..EI-KG-QA
Hefe ( <i>eno1</i> ) Ac.: P011770	48,2	..SSEFFKDG--KYDLDF..	..NFRNFLAK
Mensch ( <i>alpha-Enolase</i> ) Ac.: Q05524	42,7	..ASEFFRS-GK-YDLDF..	..KFRNFLAK
Mensch ( <i>beta-Enolase</i> ) Ac.: P13929	47,5	..ASEFYRK-GK-YDLDF..	..NFRNFKAK
Mensch ( <i>gamma-Enolase</i> ) Ac.: P09104	48,3	..ASEFYRD-GK-YDLDF..	..NFRNFLAK

**Tabelle 4:**

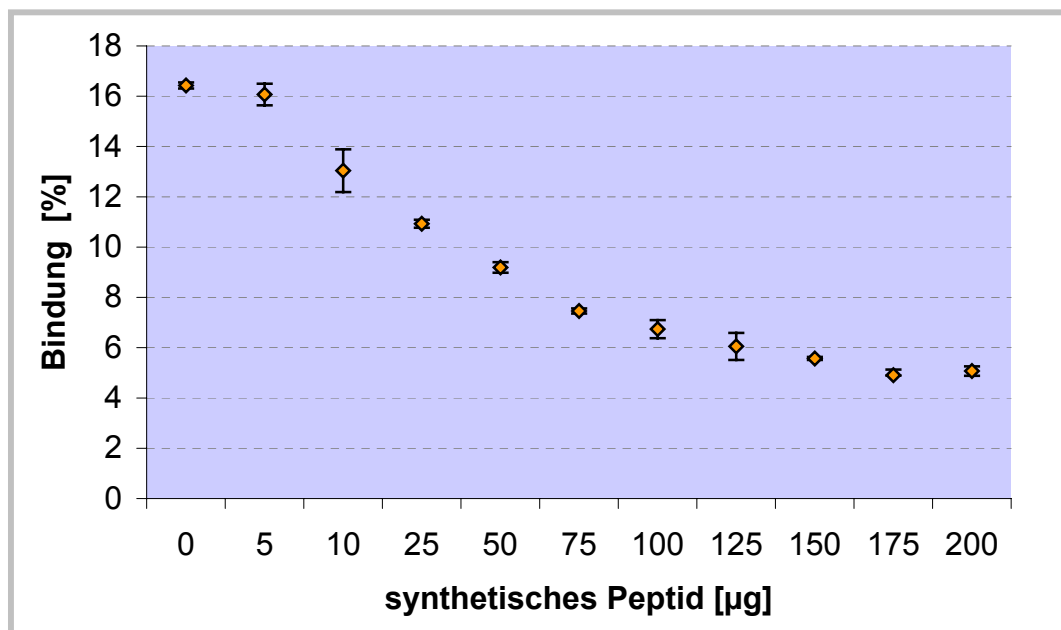
Sequenzvergleich der Enolasen verschiedener Organismen (nach Pancholi, 2001). Die Prozentangaben des Homologievergleichs beziehen sich auf die Gesamtsequenz.

Ein Vergleich der Sequenzen des internen Bindungsmotivs zeigte nur eine geringe Übereinstimmung der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin in den

ersten beiden Positionen des Bindungsmotivs (Tab. 4). Ein Sequenzvergleich zwischen Eno und humanen Enolasesequenzen zeigte Homologiewerte zwischen 40 % und 50 % (Tab. 4). In der Aminosäureabfolge des internen Bindungsmotivs stimmten die flankierenden aromatischen Aminosäuren und das Lysin an Position 7 mit der internen Bindungssequenz von *S. pneumoniae* überein. Mit Ausnahme von *Escherichia coli* und *Yersinia pestis* endete jede Enolasesequenz mit einem Lysin. Die Proteinsequenzen von *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. intermedius* und *L. monocytogenes* wiesen zwei carboxyterminale Lysine auf (Tab. 4).

### 3.7.6 Kompetitive Inhibition der Plasminogenbindung mit dem synthetischen Peptid 'FYDKERKVYD'

Zur Überprüfung der Plasminogenbindungsfunktion des durch die Spot-Membran-Analysen identifizierten internen Bindungsmotivs wurden Inhibitionsanalysen durchgeführt.



**Abbildung 38:**

Kompetitive Inhibition der Bindung von radioaktiv markiertem Plasminogen an *S. pneumoniae* R6x durch das synthetische Peptid ('FYDKERKVYD').

Ein synthetisches Peptid mit der Aminosäuresequenz 'FYDKERKVYD' (Mw: 1362,5 Da) wurde synthetisiert und in steigender Konzentration in einem

Plasminogenbindungsversuch mit unbekapselten R6x-Pneumokokken eingesetzt. In dem Bindungsversuch mit radioaktiv markiertem Plasminogen zeigte das Peptid einen inhibitorischen Effekt auf die Plasminogenbindung von Pneumokokken (*Abb. 38*). Die kompetitive Inhibition erfolgte in Abhängigkeit zur Peptidkonzentration und zeigte bei 4,704 nmol Peptid eine Reduktion der Plasminogenbindung um 50 %.

**Abbildung 39:**

DNA- und Proteinsequenz der  $\alpha$ -Enolase von *S. pneumoniae*. Die Region des katalytisch aktiven Zentrums ist blau unterlegt, die Plasminogenbindungsregionen sind orange markiert.

ATG	TCA	ATT	ATT	ACT	GAT	GTT	TAC	GCT	CGC	GAA	GTC	CTA	GAC	TCA	CGC	GGT	AAC	CCA	ACA	60
M	S	I	I	T	D	V	Y	A	R	E	V	L	D	S	R	G	N	P	T	20
CTT	GAA	GTA	GAA	GTT	TAC	ACT	GAA	TCA	GGT	GCT	TTC	GGA	CGT	GGT	ATG	GTT	CCA	TCA	GGA	120
L	E	V	E	V	Y	T	E	S	G	A	F	G	R	G	M	V	P	S	G	40
GCT	TCT	ACT	GGT	GAA	CAC	GAA	GCA	GTT	GAA	CTT	CGC	GAC	GGT	GAC	AAA	TCT	CGT	TAC	GGT	180
A	S	T	G	E	H	E	A	V	E	L	R	D	G	D	K	S	R	Y	G	60
GGT	CTT	GGT	ACA	CAA	AAA	GCT	GTT	GAC	AAC	GTA	AAC	AAC	ATC	ATT	GCT	GAA	GCT	ATC	ATT	240
G	L	G	T	Q	K	A	V	D	N	V	N	N	I	I	A	E	A	I	I	80
GGC	TAC	GAT	GTA	CGT	GAT	CAA	CAA	GCT	ATT	GAC	CGT	GCT	ATG	ATC	GCA	CTT	GAC	GGT	ACT	300
G	Y	D	V	R	D	Q	Q	A	I	D	R	A	M	I	A	L	D	G	T	100
CCT	AAC	AAA	GGT	AAA	TTG	GGT	GCG	AAT	GCA	ATC	CTC	GGT	GTG	TCT	ATC	GCT	GTA	GCT	CGT	360
P	N	K	G	K	L	G	A	N	A	I	L	G	V	S	I	A	V	A	R	120
GCT	GCT	GCT	GAC	TAC	CTT	GAA	ATC	CCA	CTT	TAC	AGC	TAT	CTT	GGT	GGA	TTC	AAC	ACT	AAA	420
A	A	A	D	Y	L	E	I	P	L	Y	S	Y	L	G	G	F	N	T	K	140
GTT	CTT	CCA	ACT	CCA	ATG	ATG	AAC	ATC	ATC	AAC	GGT	GGT	TCT	CAC	TCT	GAC	GCT	CCA	ATC	480
V	L	P	T	P	M	M	N	I	I	N	G	G	S	H	S	D	A	P	I	160
GCT	TTC	CAA	GAG	TTC	ATG	ATC	TTG	CCA	GTT	GGT	GCG	CCA	ACA	TTT	AAA	GAA	GCC	CTT	CGT	540
A	F	Q	E	F	M	I	L	P	V	G	A	P	T	F	K	E	A	L	R	180
TAC	GGT	GCT	GAA	ATC	TTC	CAC	GCT	CTT	AAG	AAA	ATC	CTT	AAA	TCA	CGT	GGT	TTG	GAA	ACT	600
Y	G	A	E	I	F	H	A	L	K	K	I	L	K	S	R	G	L	E	T	200
GCC	GTA	GGT	GAC	GAA	GGT	GGA	TTC	GCT	CCT	CGT	TTC	GAA	GGA	ACT	GAA	GAT	GGT	GTT	GAA	660
A	V	G	D	E	G	G	F	A	P	R	F	E	G	T	E	D	G	V	E	220
ACT	ATC	CTT	GCT	GCG	ATT	GAA	GCT	GCT	GGA	TAT	GTA	CCA	GGT	AAA	GAC	GTA	TTT	ATC	GGA	720
T	I	L	A	A	I	E	A	A	G	Y	V	P	G	K	D	V	F	I	G	240
TTT	GAC	TGT	GCT	TCA	TCA	GAA	TTC	TAC	GAT	AAA	GAA	CGT	AAA	GTT	TAC	GAC	TAC	ACT	AAA	780
F	D	C	A	S	S	E	F	Y	D	K	E	R	K	V	Y	D	Y	T	K	260
TTT	GAA	GGT	GAA	GGT	GCT	GCT	GTT	CGT	ACA	TCT	GCA	GAA	CAA	ATC	GAC	TAC	CTT	GAA	GAA	840
F	E	G	E	G	A	A	V	R	T	S	A	E	Q	I	D	Y	L	E	E	280
TTG	GTT	AAC	AAA	TAC	CCA	ATC	ATC	ACT	ATT	GAA	GAT	GGT	ATG	GAT	GAA	AAC	GAC	TGG	GAT	900
L	V	N	K	Y	P	I	I	T	I	E	D	G	M	D	E	N	D	W	D	300
GGT	TGG	AAA	GCT	CTT	ACT	GAA	CGT	CTT	GGT	AAG	AAA	GTA	CAA	CTT	GTT	GGT	GAC	GAC	TTC	960
G	W	K	A	L	T	E	R	L	G	K	K	V	Q	L	V	G	D	D	F	320
TTC	GTA	ACA	AAC	ACT	GAC	TAC	CTT	GCA	CGT	GGT	ATC	CAA	GAA	GGT	GCT	GCT	AAC	TCA	ATC	020
F	V	T	N	T	D	Y	L	A	R	G	I	Q	E	G	A	A	N	S	I	340
CTT	ATC	AAA	GTT	AAC	CAA	ATC	GGT	ACT	CTT	ACT	GAA	ACT	TTT	GAA	GCT	ATC	GAA	ATG	GCT	080
L	I	K	V	N	Q	I	G	T	L	T	E	T	F	E	A	I	E	M	A	360
AAA	GAA	GCT	GGT	TAC	ACT	GCT	GTT	GTA	TCA	CAC	CGT	TCA	GGT	GAA	ACT	GAA	GAT	TCA	ACA	140
K	E	A	G	Y	T	A	V	V	S	H	R	S	G	E	T	E	D	S	T	380
ATC	GCT	GAT	ATT	GCA	GTT	GCA	ACT	AAC	GCA	GGA	CAA	ATC	AAG	ACT	GGT	TCA	CTT	TCA	CGT	200
I	A	D	I	A	V	A	T	N	A	G	Q	I	K	T	G	S	L	S	R	400
ACA	GAC	CGC	ATC	GCT	AAA	TAC	AAC	CAA	TTG	CTT	CGT	ATC	GAA	GAC	CAA	CTT	GGT	GAA	GTA	260
T	D	R	I	A	K	Y	N	Q	L	L	R	I	E	D	Q	L	G	E	V	420
GCT	GAA	TAT	CGT	GGA	TTG	AAA	TCA	TTC	TAC	AAC	CTT	AAA	AAA	TAA	1305					
A	E	Y	R	G	L	K	S	F	Y	N	L	K	K	.	434					

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Plasminogenbindung von Mikroorganismen

Eine spezifische Bindung von Plasminogen konnte nicht nur für Plasmaproteine wie Fibrinogen (Miles und Plow, 1985) und für Annexin II (Cesarman *et al.*, 1994) sondern auch für eukaryotische  $\alpha$ -Enolasen (Redlitz *et al.*, 1995) gezeigt werden. Neben Blutplättchen (Miles und Plow, 1985) und Monozyten (Plow *et al.*, 1986), binden unterschiedliche epitheliale Zelltypen und verschiedene Zellen des Endothels spezifisch Plasminogen (Plow *et al.* 1986; Hajjar *et al.*, 1987; Miles und Plow, 1987; Miles *et al.*, 1988).

Auch Gram-positive und Gram-negative Mikroorganismen exprimieren spezifische Plasminogenrezeptoren (Tab. 5). Dazu zählen *Staphylococcus aureus*, Gruppe A, C und G-Streptokokken, sowie *Salmonella enterica*, Meningitis-assoziierte *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* und *Neisseria meningitidis* aber auch *Borrelia burgdorferi* sowie *Yersinia pestis* (Kuusela und Saksela, 1990; Kuusela *et al.*, 1992; Parkkinen *et al.*, 1991; Parkkinen und Korhonen, 1989; Sjöbring *et al.* 1994; Ullberg *et al.*, 1990; 1989 und 1992; Hu *et al.*, 1997 und 1998; Fuchs *et al.*, 1994). Einige der identifizierten prokaryotischen Plasminogenrezeptoren wurden bereits näher charakterisiert (Tab. 5). So handelt es sich bei der Streptokinase von *Streptococcus pyogenes* (Matsuo *et al.*, 1990) und der Staphylokinase von *Staphylococcus aureus* (Tewodros *et al.*, 1995) um Plasminogenbindungsproteine, die Plasminogen binden und in aktives Plasmin prozessieren können. Aber auch das M-like-Protein (PAM) der pyogenen Streptokokken und Fimbrienstrukturen von *Escherichia coli* und Salmonellen weisen spezifische Bindungseigenschaften an Plasminogen auf (Parkkinen und Korhonen, 1989). Die Induktion der proteolytischen Gewebedegradation durch Aktivierung des Plasminogens auf Zelloberflächen hat signifikante Auswirkungen auf Wundheilungs- und Gewebserneuerungsprozesse, Embryogenese auf die Ausbreitung und Metastasierung von Tumorzellen (Plow *et al.*, 1995). Die Funktion der Plasminogenbindung an pathogene Mikroorganismen ist daher seit einiger Zeit Gegenstand der Pathogenitätsforschung.

Organismus	Proteinbezeichnung	MG	Literatur	Accession. Nr.
<b><i>Streptococcus pyogenes</i></b>	Alpha-Enolase (SEN)	47 kDa	Pancholi und Fischetti, 1997	n.b.
	Plasminogenbindungs-M-like-Protein (PAM)	43 kDa	Berge und Sjobring, 1993	Z22219
	GAPDH (GAP/PLR/SDH)	36 kDa	Lottenberg <i>et al.</i> , 1992	P50467
	Streptokinase (SKA)	52 kDa	Christensen, 1945	Z48617
<b><i>Streptococcus uberis</i></b>	Streptokinase (SKC)	34 kDa	Johnson <i>et al.</i> , 1999	AJ131604
	Plasminogen-Aktivatorprotein (PauA)	33 kDa	Rosey <i>et al.</i> , 1999	AJ012549
	Plasminogen-Aktivatorprotein (PauB)	45kDa	Ward und Leigh, 2002	AJ314852
<b><i>Streptococcus equisimilis</i></b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPC)	36 kDa	Gase <i>et al.</i> , 1996	Q59906
<b><i>Streptococcus</i> sp. Gruppe C</b>	Plasminogen-Bindungsprotein (MLC36)	53 kDa	Ben Nasr <i>et al.</i> , 1994	Z32677
<b><i>Streptococcus</i> sp. Gruppe G</b>	Plasminogen-Bindungsprotein (MLG72)	56 kDa	Ben Nasr <i>et al.</i> , 1994	Z32678
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	Staphylokinase	16 kDa	Sako und Tsuchida, 1983	X00127
<b><i>Yersinia pestis</i></b>	Plasminogen-Aktivatorprotein (PLA)	35 kDa	Hu <i>et al.</i> , 1998	AF053945
<b><i>Haemophilus influenzae</i></b>	Aspartase	55kDa	Sjostrom <i>et al.</i> , 1997	P44324
<b><i>Escherichia coli</i></b>	G-Fimbrien	27kDa/UE	Kukkonen <i>et al.</i> , 1998	L33969
<b><i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhimurium</i></b>	Typ-1-Fimbrien	20kDa/UE	Kukkonen <i>et al.</i> , 1998	M18283
<b><i>Borrelia burgdorferi</i></b>	Plasminogen-Bindungsprotein (BPBP-70)	70 kDa	Hu <i>et al.</i> , 1997	AF005657
	Outer surface protein A (OspA)	30 kDa	Fuchs <i>et al.</i> , 1994	AAB23809
<b><i>Pneumocystis carinii</i></b>	Enolase	47 kDa	Fox und Smulian, 2001	AAD02812

**Tabelle 5:**

Prokaryotische Plasminogenbindungsproteine und Aktivatoren.

#### 4.1.1 Plasminogenbindung von *S. pneumoniae*

In ersten Studien zur Plasminogenbindung wurde bereits 1989 beobachtet, dass *Streptococcus pneumoniae* neben fünf weiteren  $\alpha$ -hämolytischen Stämmen spezifisch humanes Plasminogen bindet (Ullberg *et al.*, 1989). Ergebnisse von Transmigrationsversuchen mit Pneumokokken unter Verwendung von künstlichen Basalmembranen führten 10 Jahre später zur Annahme, dass auch dieser humanpathogene Erreger die proteolytischen Aktivität des Plasmins zur erleichterten Migration durch Gewebe und damit einhergehender Kolonisierung nutzt (Eberhard *et al.*, 1999). Bislang war jedoch unklar, welche Rezeptoren die Interaktion zwischen den Pneumokokken und Plasminogen vermitteln.

In dieser Arbeit konnte die Plasminogenbindung an verschiedenen *S. pneumoniae* Stämmen bestätigt werden. Hierbei zeigte Plasminogen eine Bindung an Pneumokokken unabhängig vom Serotyp und damit unabhängig vom Kapselpolysaccharid und von der Isolierungsquelle. Die unterschiedliche Expression von Virulenzfaktoren der transparenten und opaken Pneumokokkenvarianten zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Plasminogenbindungsaktivität. Der Nachweis der Plasminogenbindungsfähigkeit bei jedem Pneumokokken-Stamm ist ein Hinweis darauf, dass es sich dabei um eine konservierte Eigenschaft des Erregers handelt und somit für den Mikroorganismus von hoher funktioneller Relevanz ist.

Während die Werte der Bindungsversuche mit radioaktiv markiertem Plasmin zunächst keine spezifische Interaktion mit Pneumokokken zeigten, konnte in SPR-Studien und im Blot-overlay mit rekombinantem Eno-Protein die Bindung von Plasmin nachgewiesen werden. Die Bindungsversuche mit radioaktiv markiertem Plasmin wurden nach Zusatz des Serinproteaseinhibitors Aprotinin durchgeführt, um eine Proteolyse der bakteriellen Oberflächenproteine durch Plasmin zu verhindern. Die Bindung von Aprotinin an Plasmin könnte zu einer Inhibition der Interaktion der Serinprotease mit Pneumokokken zur Folge haben (Fritz und Wunderer, 1983). Dieser inhibitorische Effekt könnte niedrigen Bindungswerte erklären.

In weiteren Bindungsversuchen konnte die Interaktion von Plasminogen mit Pneumokokken durch Zugabe von Glu-Plasminogen in physiologischen Konzentrationen inhibiert werden. Dieses Ergebnis bestätigte die Spezifität der Plasminogenbindung. Die Untersuchung der Plasminogenbindung nach Präinkubation der Pneumokokken mit proteolytischen Enzymen wie Hyaluronidase,

Neuraminidase und Pronase E zeigten ebenfalls eine Reduktion der Plasminogenbindung nach Pronase E-Inkubation. Dieses Ergebnis war ein erster Hinweis darauf, dass es sich bei den Plasminogenrezeptor(en) um Protein-komponenten auf der bakteriellen Oberfläche handeln könnte. Nach Inkubation mit den Enzymen Hyaluronidase und Neuraminidase konnte keine Reduktion der Plasminogenbindung nachgewiesen werden. Die enzymatischen Studien zeigten, dass keine Hyaluronsäuren und auch keine Sialinsäuren an der Plasminogenbindung beteiligt sind.

In Blot-overlay Analysen mit radioaktiv markiertem Plasminogen reagierten bis zu 9 verschiedene Proteinbanden der unterschiedlichen Pneumokokken-Serotypen mit Plasminogen. Dabei wurde in jedem Protein-Lysat das gleiche Muster von Proteinbanden nachgewiesen. Die untersuchten Pneumokokken-Stämme wiesen demnach ein ähnliches Repertoire an Plasminogenbindungsproteinen auf. In Blot-overlay-Analysen mit Zytosol- und Zellwandfraktionen von verschiedenen *S. pneumoniae*-Stämmen konnte eine 47 kDa-Bande detektiert werden, die eine starke Affinität für humanes Plasminogen zeigte. Durch Homologievergleiche nach N-terminaler Sequenzanalyse konnte dieses Protein als  $\alpha$ -Enolase von *Streptococcus pneumoniae* identifiziert werden. Dieses Protein zeigte 96,3 % Sequenzidentität zur Enolase SEN (streptococcal surface enolase), die auf der Oberfläche von *Streptococcus pyogenes* als Plasminogen- und auch Plasmin-bindendes Glykolyseprotein indentifiziert wurde (Pancholi und Fischetti, 1998).

#### 4.2 Glykolyseenzyme als Plasminogenrezeptoren

Es wurden bereits verschiedene Interaktionen von Glykolyseenzymen mit Plasmin(ogen) nachgewiesen. Die oberflächenlokalisierte Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase GAPDH von *Streptococcus pyogenes* (SDH, surface associated dehydrogenase) wurde nahezu zeitgleich mit dem strukturell und funktionell ähnlichen Plr als eines der ersten Plasmin(ogen)-bindenden prokaryotischen Glykolyseenzyme von Gruppe A-Streptokokken identifiziert und charakterisiert (Lottenberg *et al.*, 1992a; Pancholi und Fischetti 1992; Winram und Lottenberg, 1998). Die N-terminale Sequenzanalyse einer 42 kDa-Bande, die im Blot-overlay von *S. pneumoniae* -Lysaten eine Reaktion mit Plasminogen zeigte,



wurde ebenfalls als GAPDH identifiziert. Rekombinante GAPDH von *S. pneumoniae* zeigte auch in Dot-Spot-Analysen unter nativen Bedingungen und in SPR-Studien eine Plasminogenbindungsaktivität. In elektronenmikroskopischen Studien mit anti-GAPDH-Antikörpern, die nach Immunisierung mit rekombinantem GAPDH-Protein generiert wurden, konnte das Protein auf der Oberfläche von *S. pneumoniae*-Bakterien nachgewiesen werden. Weitere Analysen sind notwendig, um die Funktion von GAPDH als Plasminogenbindungsprotein auf der Oberfläche von Pneumokokken zu bestätigen.

Humane Enolasen sind in verschiedene pathophysiologische Inzidenzen involviert. So steht eine erhöhte Expression von Enolase in direkter Korrelation zur Progression von neuroendokrinen Tumoren und Neuroblastom- und Lungentumoren (Kato *et al.*, 1983; Royds *et al.*, 1982; Niklinski und Furman 1995; Cooper, 1994; Kaiser *et al.*, 1989). Des weiteren wurde gezeigt, dass Anti-Enolase-Antikörper verschiedene Autoimmunerkrankungen auslösen können. Anti-Enolase-Antikörper sind in die Entwicklung systemischer rheumatischer Erkrankungen involviert. Darüber hinaus beeinflussen sie die Mikrotubuliorganisation der Zellen durch Interaktion mit den Zentrosomen (Rattner *et al.*, 1991). Enolasen wurden außerdem als starkes Allergen bei Inhalationsallergien gegen Pilzarten identifiziert (Baldo und Baker, 1988). So konnten bei Patienten mit *Candida albicans*-Allergie spezifische Immunglobulin E-Antikörper gegen Enolase nachgewiesen werden (Ito *et al.*, 1995).

Enolasen wurden erstmals 1934 von Lohmann und Meyerhof beschrieben und werden genauer als Phosphopyruvathydratasen bezeichnet (Lohman und Meyerhof, 1934). Sie gehören in die Klasse der metallionenaktivierten Enzyme und katalysieren die Dehydration und Interkonversion von 2-Phospho-D-Glycerat (PGE) in Phosphoenolpyruvat (PEP) (Abb. 5; Wold 1971; Lebioda *et al.*, 1989). Es handelt sich hierbei um eine  $\beta$ -Eliminierungsreaktion von Hydroxylionen vom C3-Atoms des Enolatintermediats nachdem ein Proton vom C2-Atom des 2-Phospho-D-Glycerats im Rahmen einer Säure-Base-Katalyse entfernt wurde. Durch spezifische Mutagenese und Röntgenkristallstrukturanalyse wurden die für die enzymatische Reaktion entscheidenden Aminosäuren im katalytisch aktiven Zentrum des Enolasemoleküls identifiziert (Pancholi, 2001). Die katalytische Aktivität von Enolasen wird durch Substratanaloga wie Phosphoglykolat und durch Fluoride kompetitiv inhibiert (Lebioda und Stec, 1991; Guha-Chowdhury *et al.*, 1997). Die Enolasen werden nach der Anzahl der benötigten basischen Aminosäuren für die

Ausbildung des Enolatintermediats in drei Subklassen unterteilt: (i) eine Subklasse von Enolasen, die einen einzelnen Lysinrest nutzen, (ii) eine Mandelat-Razemase Subklasse, die entweder ein einzelnes Lysin und/oder einen Histidinrest benötigt und (iii) eine Mukonat-Lakton-Enzymsubklasse, die zwei Lysinaminosäurereste nutzt (Gulick *et al.*, 2000). Im anabolen Verlauf der Glukoneogenese katalysiert das gleiche Enzym die Phosphopyruvat-Hydratase-Reaktion. Vertebraten exprimieren drei Enolase-Isoformen.  $\alpha$ -Enolasen kommen ubiquitär in verschiedenen Geweben und in der Leber vor, während  $\beta$ -Enolasen ausschließlich im Muskelgewebe und die  $\gamma$ -Isoform in Neuronen und in neuroendokrinem Gewebe zu finden ist (Marangos *et al.*, 1978). Jede dieser Isoformen besteht aus zwei identischen Untereinheiten und weist ein Molekulargewicht zwischen 82 und 100 kDa auf (Wold, 1971; Malstrom, 1961). Die Aktivität der Enolasen ist abhängig von der Präsenz zweiwertiger Ionen. Die Bindung von zweiwertigen Magnesiumionen als natürliches Aktivator-Ion ist ein Zwei-Schritt-Prozess. Im ersten Schritt induziert die Bindung eines Magnesiumions zunächst eine Konformationsänderung und ermöglicht so die eigentliche Substratbindung. Die Aktivierung der enzymatischen Katalyse erfolgt danach durch die Bindung des zweiten Magnesiumions (Faller *et al.*, 1977). Zwei- und dreiwertige Metallionen zeigen eine Abstufung im Niveau ihres Aktivierungspotenzials:  $\text{Mg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Fe(II)}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$  (Wold, 1971; Malstrom, 1961; Brewer und Ellis, 1983).

In einem Enzymassay, in dem die Umsetzung von 2-Phosphoglycerinsäure in Phosphoenolpyruvat photometrisch bestimmt wurde, erfolgte die Bewertung der Enolaseaktivität des rekombinanten Eno-Proteins. Es zeigte sich, dass das affinitätschromatographisch aufgereinigte Protein enzymatisch aktiv war. Die vorhandene Enolaseaktivität war ein deutlicher Hinweis darauf, dass das Protein in seiner physiologischen Molekülstruktur vorlag und die aminoterminal fusionierten Histidine keinen Einfluss auf die Molekülstruktur und auf die enzymatische Aktivität hatten. Die ermittelten Werte für die katalytischen Parameter  $k_M$  und  $V_{\max}$  lagen in der gleichen Größenordnung wie für die Enolase von *Streptococcus pyogenes*. Auch intakte Pneumokokken zeigten eine Umsetzung von 2-Phosphoglycerinsäure in Abhängigkeit von der Bakterienzellzahl. Obgleich die Bakterien während des Enzymassays sehr schonend behandelt wurden, kann eine Autolyse der Pneumokokken, die zu einer Freisetzung von zytosolischem Eno geführt haben könnte, nicht ausgeschlossen werden. Da Glykolysenzime mit bis zu 1% zu den in

größter Menge exprimierten Proteine des Zytosols gehören, könnte die gemessenen Aktivität auf freigesetztes Eno-Protein zurückzuführen sein. Die Korrelation zwischen der steigenden Bakterienzahl und der Umsatzrate spricht jedoch für eine definierte Enzymaktivität der an der Oberfläche lokalisierten Proteine.

In molekulargenetischen Studien mit verschiedenen Serotypen von *S. pneumoniae* konnte gezeigt werden, dass das 1305 bp große Gen für die Enolase im Genom von allen untersuchten Pneumokokken nachgewiesen werden konnte. Ein Homologievergleich zwischen den Pneumokokken-Stämme R6 und TIGR 4 der Sequenzdatenbank und des Serotyp-2-Stammes ATCC 11733 (P51) ergab eine 100 %ige Übereinstimmung der *eno*-DNA-Sequenz. RFLP-Analysen des *eno*-Gens mit verschiedenen Restriktionsenzymen zeigten, dass das Gen für die Enolase in verschiedenen Serotypen hoch konserviert ist. Expressionsstudien zeigten außerdem die Expression von Eno in jedem getesteten Pneumokokkenstamm mit einem MG von 47 kDa. Darüber hinaus konnte für jedes exprimierte Eno-Protein im Blot-Overlay eine Plasminogenbindungsaktivität nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Plasminogenbindung an Eno eine konservierte Eigenschaft der Pneumokokken ist, die dem humanpathogenen Erreger einen wichtigen Vorteil bringt. Im Gegensatz zur Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) handelt es sich bei der  $\alpha$ -Enolase jedoch nicht um ein konstitutiv exprimiertes Haushaltsgen, da die Expression in Abhängigkeit von der Pathophysiologie, metabolischen Bedingungen und dem Entwicklungsstand der Zellen variiert (McAlister und Holland, 1982).

#### 4.2.1 Oberflächenlokalisierung und Reassoziatio

Prokaryotische Enolasen sind in ihrer Struktur hoch konserviert (Pancholi, 2001) und zeichnen sich auf Grund ihrer Multifunktionalität als essentielle Elemente der unterschiedlichen bakteriellen Überlebensstrategien aus. Neben anderen glykolytischen Enzymen wie GAPDH und Phosphofruktokinase wird die Enolase sowohl auf der Oberfläche von verschiedenen Mikroorganismen wie Gram-positiven Kokken, in der Zellwand von *Candida* (Angiolella *et al.*, 1996) und verschiedenen Parasiten aber auch von verschiedenen eukaryotischen Zellen wie Monozyten, T- und B-Zellen, neuronaler Zellen und Endothelzellen exprimiert (Miles *et al.*, 1991;

Nakajima *et al.*, 1994; Dudani *et al.*, 1993; Redlitz *et al.*, 1995). Die Mechanismen zur Sekretion und Zellwandverankerung der Enolasen sind noch nicht aufgeklärt. Der Nachweis des Proteins SEN auf der Oberfläche von *Streptococcus pyogenes* und die Identifikation von Eno in der Zellwandfraktion von Pneumokokken waren jedoch erste Hinweise auf eine Oberflächenlokalisation.

Das Eno-Protein konnte in elektronenmikroskopischen Studien an Ultradünnschnitten von Pneumokokken in jedem bakteriellen Kompartiment detektiert werden. Das Glykolyse-Protein war in hoher Menge im Zytosol vorhanden, es konnte jedoch auch an der Innenseite der Zellmembran, in den einzelnen Zellwandschichten und an der Oberfläche von unbekapselten sowie bekapselten Pneumokokkenstämmen nachgewiesen werden. Im Fall der bekapselten Pneumokokken wurde das Eno-Protein hauptsächlich am äußersten Rand der Polysaccharidkapsel in einiger Distanz zur Zellwand detektiert. Diese Beobachtungen deuteten auf einen Sekretionsmechanismus für die Enolase hin. Es konnte jedoch in der Aminosäuresequenz keine der für Sekretionssysteme charakteristische Signalsequenz oder eine typische Spaltstelle für Proteasen detektiert werden (Blobel, 1980; Von Heijne und Blomberg 1979). Im Gegensatz zu den gut charakterisierten Sekretionsapparaten Gram-negativer Bakterien ist bislang noch wenig bekannt über die entsprechenden Strukturen bei Gram-positiven Mikroorganismen. Für einige Gram-positive Bakterien wie für *Bacillus subtilis* konnte eine Sec-abhängige Proteinsekretion nachgewiesen werden (Freudl, 1992). Dieser konservierte Sekretionsmechanismus transportiert ungefaltete Proteine aus dem Zytoplasma in das Periplasma in Abhängigkeit von einer aminoterminalen Signalsequenz. Für *Streptomyces lividans* wurde neben dem Sec-Mechanismus ein weiterer Transportweg beschrieben (Schaerlaekens *et al.*, 2001). Dieser Transportweg wird als TAT-Protein-Transport (**T**win-**A**rginine-**T**ranslocation) -System bezeichnet. Proteine, die über den TAT-Weg transportiert werden, enthalten ein aminoterminalen Signalpeptid mit zwei Argininen (Sargent *et al.*, 2002). In der Aminosäuresequenz der Enolase von Pneumokokken konnte keine der für diese Sekretionssysteme charakteristischen Signalpeptide oder typische Spaltstellen für Proteasen detektiert werden (Blobel, 1980; Von Heijne und Blomberg, 1979).

In Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem Plasminogen konnte nach Inkubation der Pneumokokken mit Eno-Protein keine Inhibition der Plasminogenbindung an *Streptococcus pneumoniae* beobachtet werden. Im Gegensatz dazu kam es zu einer

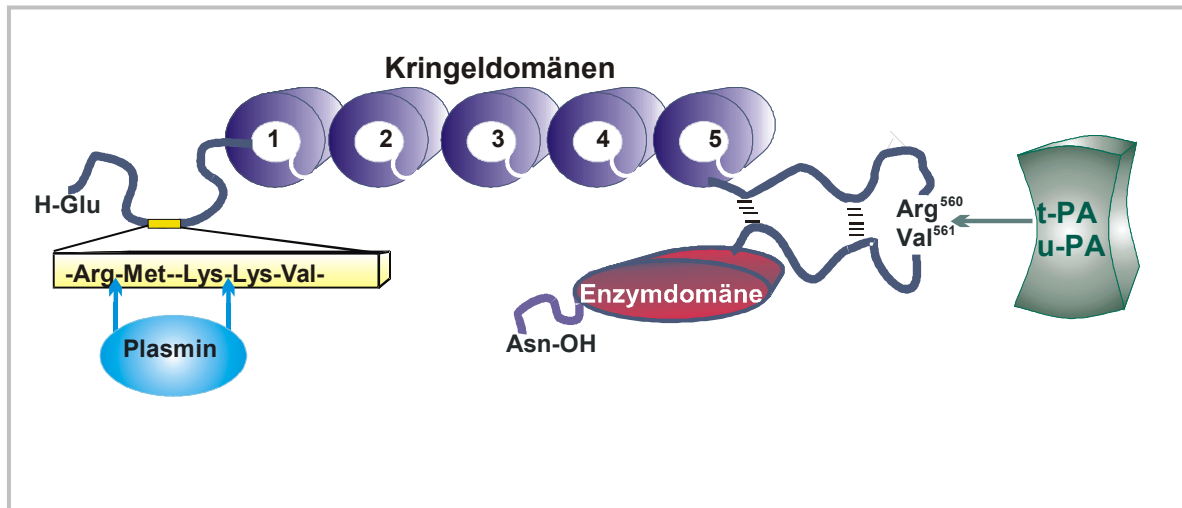
Verstärkung der Plasminogenbindungsaktivität nach Präinkubation mit dem Eno-Protein, die auf eine Interaktion von Eno mit Pneumokokken hinwies. Die vermutete Reassoziations von Eno an die bakterielle Oberfläche konnte durch Bindungsversuche mit radioaktiv markiertem Eno-Protein bestätigt werden. Auch in elektronenmikroskopischen Studien wurde die Fähigkeit von Eno, an die bakterielle Oberfläche zu reassoziieren, bestätigt. So zeigten Pneumokokken eine stärkere Plasminogenbindungsaktivität, wenn zuvor eine Präinkubation mit Eno-Protein erfolgt war. Der Verankerungsmechanismus der Enolase an der Oberfläche ist jedoch bislang noch nicht aufgeklärt. Das Eno-Protein verfügt nicht über hydrophobe Bereiche zur Membranintegration und enthält keines der typischen Motive LPXTGX bzw. LXXC Gram-positiver Bakterien zur kovalenten Proteinverankerung in der Zellwand (Abb. 2; Fischetti *et al.*, 1990; Navarre und Schneewind, 1999). Ebenfalls fehlen die für einige Oberflächenproteine von Pneumokokken typischen Cholinbindungsrepeats, die eine Bindung der Proteine an das Phosphorylcholin der Lipoteichonsäuren und Teichonsäuren der Zellwand vermitteln. SPR-Bindungsstudien mit rekombinantem Eno-Protein zeigten, dass zwischen dem immobilisierten Eno-Protein und Eno in Lösung keine Dimerisierung stattfand. Muskelspezifische Enolasen binden mit hoher Affinität an andere z.T. glykolytisch aktive Proteine wie Phosphoglycerat Mutase, Muskel Kreatinkinase, Pyruvatkinase und Muskeltroponin (Merkulova *et al.*, 1997) und können so effizientere Reaktionskomplexe bilden. Neben der Phosphofruktokinase und der Phosphoglyceratkinase konnte auch die Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) im Blot-overlay als weitere mögliche Plasminogenbindungsproteine identifiziert werden. Die GAPDH konnte mit spezifischen Antikörpern in elektronenmikroskopischen Studien ebenfalls an der Pneumokokkenoberfläche nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis führt zu der Vermutung, dass Glykolyseenzyme in größeren Komplexen an der Oberfläche vorliegen, in denen eine Komponente die direkte Bindung an die Bakterienoberfläche vermittelt, während weitere Proteine daran assoziiert vorliegen. Die erhöhte Plasminogenbindungsaktivität nach der Reassoziations von Eno an der bakteriellen Oberfläche kann zur schnelleren Ausbreitung der Pneumokokken im Gewebe beitragen.

### 4.3 Aufbau und Struktur von humanem Plasmin(ogen)

Das monomere 92 kDa schwere Plasmaglobulin Plasminogen ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix. Plasminogen wird in der Leber (Maturen und Barnhart, 1975), in den Nieren (Highsmith *et al.*, 1971) und in den eosinophilen Granulozyten (Barnhart und Riddle, 1963) gebildet. Die Plasminogenkonzentration im menschlichen Plasma beträgt  $1.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$  (Rabiner *et al.*, 1969) bei einer Halbwertszeit von  $2.24 \pm 0.29$  Tagen (Collen und Verstraete, 1975a). Humanes Plasminogen kommt unter physiologischen Bedingungen mono - oder diglykosiliert vor und besteht aus 791 Aminosäuren (Ponting *et al.*, 1992). Es gehört zur Familie der  $\beta$ -Globuline und besteht aus einem aminoterminalen Peptid (5 kDa) gefolgt von fünf homologen Kringelmotiven, in denen Lysinbindungsstellen (LBS) vorhanden sind, sowie einer Enzymdomäne (Aminosäuren 562 bis 791, Abb. 41; Miyashita *et al.*, 1988). Die vollständige, inaktive Form des Zymogens Plasminogen wird nach der aminoterminalen Aminosäure als Glu-Plasminogen bezeichnet. Glu-Plasminogen weist eine geschlossene, rechtsgerichtete, spiralförmige Konformation auf, die auf intramolekulare Interaktionen zwischen den Lysinbindungsstellen und den Lysinen des aminoterminalen Peptides zurückzuführen ist (Tranqui *et al.*, 1979; Ponting *et al.*, 1992; Cockell *et al.*, 1998).

Das Zymogen Plasminogen wird nach Bindung von Aktivatoren zur Serinprotease Plasmin prozessiert. Wechselwirkungen zwischen physiologischen Substraten wie Fibrin sowie zwischen lysinreichen Substratanaloga wie 6-Aminohexansäure (EACA) und multiplen Bindungsstellen im Glu-Plasminogenmolekül führen zu einer Öffnung der Molekülkonformation. Diese Konformationsänderung führt zur Bindung und anschließenden Aktivierung durch physiologische Plasminogenaktivatoren wie dem Gewebetyp-Plasminogenaktivator (t-PA; tissue-type plasminogen activator; 70 kDa) und der Urokinase (u-PA, urokinase-type plasminogen activator; 54 kDa, Higgins und Bennett, 1990; De Munk und Rijken, 1990; Markus *et al.*, 1979 und 1978). Der Aktivator t-PA bindet in monomerer Form und als Dimer Fibrin und zeigt fibrinolytische Aktivität (Hoylaerts *et al.*, 1982). Das einzelsträngige Urokinase ist dagegen ein Proenzym, das erst nach Dimerisierung als u-PA aktiv wird (Gurewich *et al.*, 1984). Bereits aktiviertes Plasmin spaltet die aminoterminalen Peptide durch Hydrolyse der Peptidbindungen vor den Aminosäuren Met 69, Lys 78 und Val 79 vom Plasminogen (Wiman und Wallen, 1973; Abb. 41). Die dadurch entstehenden

verkürzten Plasminogenmoleküle werden generell als "Lys-Plasminogen" bezeichnet und weisen eine höhere Aktivierungsrate auf, als das Glu-Plasminogen (Hoylaerts *et al.*, 1982). Lys-Plasminogen ist unter physiologischen Bedingungen nicht im humanen Plasma nachzuweisen und es konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei nicht um ein Intermediat im Verlauf der Plasminogenaktivierung handelt (Holvoet *et al.*, 1985, Rouy und Anglés-Cano, 1990).



**Abbildung 41:**

Molekülstruktur von humanem Plasminogen (nach Miyashita *et al.*, 1988) mit den Proteolysedomänen für t-PA, u-PA und Plasmin.

Aufgrund bekannter struktureller intra- und intermolekularen Interaktionen wird derzeit das Vorkommen von drei strukturell und funktionell unterschiedlichen Plasminogenkonformationen postuliert:

- (i) Plasmin(ogen)  $\alpha$ : eine kompakte spiralförmige Konformation des Glu-Plasminogens durch intramolekulare Interaktionen zwischen dem aminoterminalen Peptid und der fünften Kringeldomäne sowie zwischen den Kringeldomänen eins bis drei und dem Bereich der vierten Kringelstruktur
- (ii) Plasmin(ogen)  $\beta$ : eine geöffnete Konformation des Lys-Plasminogens nach Proteolyse des aminoterminalen Peptides oder hervorgerufen durch partielle Ligandenbindung an Glu-Plasminogen, während intramolekulare Interaktionen zwischen Kringel eins bis drei und Kringel vier noch bestehen

- (iii) Plasmin(ogen)  $\gamma$ : eine vollständig geöffnete Plasminogenkonformation ohne lysinabhängige intramolekulare Interaktionen (Ponting *et al.*, 1992).

Plasminogenaktivatoren spalten das in offener Konformation vorliegende Lys-Plasminogenmolekül zwischen den Aminosäuren Arg 561 und Val 562 in eine schwere Kette (65 kDa), die die Kringelmotive enthält und in die carboxyterminale leichte Kette mit der Enzymdomäne (25 kDa; Ponting *et al.*, 1992). Beide Ketten bleiben über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die Kringeldomänen vermitteln die Bindung von unterschiedlichen Liganden an Plasminogen. Zu den wichtigsten Liganden in physiologischen Prozessen zählen Fibrin und der Plasminogenregulator  $\alpha_2$ -Antiplasmin. Kringeldomänen sind ca. 80 Aminosäuren umfassende Tertiärstrukturen, die durch Disulfidbrücken nach einem typischen Muster (C1-6, C2-4, C3-5) ausgebildet werden (Bürgin und Shaller, 1998; Abb. 42). Sie sind in unterschiedlicher Anzahl Bestandteil verschiedener Proteine, von denen einige als Fibrinolysefaktoren identifiziert wurden. So enthalten t-PA und Prothrombin zwei Kringeldomänen (Pennica *et al.*, 1983; Magnusson *et al.*, 1975), während sowohl Urokinase als auch der Koagulasefaktor XII jeweils eine kringelähnliche Domäne aufweisen (Günzler *et al.*, 1982; McMullen und Fujikawa, 1985). Kringeldomänen werden darüber hinaus in vier Kopien im Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF) und Hepatozyten Wachstumsfaktorähnlichen Proteinen sowie in bis zu 38 Kopien im Apolipoprotein beschrieben (Nakamura *et al.*, 1989; Han *et al.*, 1991; McLean *et al.*, 1987). Es konnte gezeigt werden, dass die Kringeldomänen die Bindung an Fibrin (Lucas *et al.*, 1983; Wu *et al.*, 1990), an  $\alpha_2$ -Antiplasmin (Wiman *et al.*, 1979), an Histidin-reiche Glykoproteine (HRGP, Lijnen *et al.*, 1980), Thrombospondin (DePoli *et al.*, 1989) und an zelluläre Rezeptoren (Miles *et al.*, 1991) vermitteln. Das aus den ersten 4 Kringeldomänen bestehende Plasminogenteilfragment Angiostatin greift in Endothelzellmigration und Zellproliferation ein und spielt in dem Zusammenhang eine wichtige Rolle im Prozess der Angiogenese. Während die Kringeldomänen 1-3 des Angiostatins einen stark hemmenden Effekt auf die Zellproliferation haben, zeigt ausschließlich die vierte Kringeldomäne eine inhibitorische Wirkung auf Zellmigrationen (Weidong-Richard *et al.*, 1998). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Angiostatin die Metastasierung von Tumorzellen inhibiert (O'Reilly *et al.*, 1994). Die Kringeldomänen des low-density-plasma Lipoprotein A weisen besonders hohe Homologie zur vierten Kringeldomäne des humanen Plasminogens



auf und haben die Fähigkeit, sowohl die Bindung zwischen Plasminogen und Monozyten der Zelllinie U-937 als auch zu Endothelzellen zu inhibieren (Gonzales-Gronow *et al.*, 1989; Miles *et al.*, 1989; Hajjar *et al.*, 1989). Die Lysinbindungsstellen des Lipoprotein A konkurrieren mit Plasminogen um die Bindungsstellen des Fibrins sowie des physiologischen Aktivators t-PA. Diese kompetitive Bindungseigenschaft führt zur Inhibition der Fibrinolyse, wodurch es zur Bildung von arteriosklerotischen Läsionen kommen kann (Ponting *et al.*, 1992). In SPR-Bindungsstudien zeigte sich, dass die Bindung der Enolase von *S. pneumoniae* an Plasminogen nicht humanspezifisch ist, sondern dass gleichermaßen eine Interaktion mit bovinem Plasminogen stattfindet. Ein Sequenzalignment der Plasminogensequenzen verschiedener Vertebraten nach der Clustal-Methode zeigte starke Homologien. So beträgt die Sequenzidentität auf Proteinebene zwischen humanem Plasminogen (P00747) und dem von Rhesusaffen (P12545) 92,8 %, zu dem Plasminogen aus dem Schwein (P06867) 80 %, zu Maus-Plasminogen (P20918) 78,7 % und immer noch 77 % zu Rinder-Plasminogen (P06868). Die starken Homologien erklären die Kreuzreaktionen von Eno mit dem Plasminogen anderer Vertebraten.

Die proteolytische Degradation der Serinprotease Plasmin ist ein wichtiger Bestandteil zur Regulation der Blutgerinnung, fördert Zellmigrationsvorgänge und dient der Aufrechterhaltung der Hämöostase (Plow *et al.*, 1991 und 1995; Saksela und Rifkin, 1988). Der Abbau von Fibrin im Rahmen der Fibrinolyse setzt unmittelbar nach der Bildung von Blutgerinnseln ein und verläuft in einem stetigen Gleichgewicht zur Blutgerinnung während des gesamten Wundheilungsprozesses. Die Induktion der Fibrinolyse kann entweder intrinsisch über verschiedene Plasmafaktoren wie Kallikrein oder durch serinproteolytische Plasminogenaktivatoren wie t-PA und u-PA extrinsisch erfolgen. Als nicht-physiologischer Aktivator wird außerdem die Streptokinase zusammen mit u-PA und t-PA pharmakologisch zur Thrombenauflösung eingesetzt. Die Interaktion der Streptokinase mit Plasminogen erfolgt hierbei direkt im Bereich der serinproteolytischen Enzymdomäne (Ponting *et al.*, 1992). Im Verlauf der Fibrinolyse kommt es zur Spaltung von Fibrinogen in Fibrin durch Thrombin. Hierbei werden die spezifischen Bindungsstellen von Fibrin für Plasminogen und t-PA zugänglich (Mosesson, 1990). Die Bindung von Fibrin an Plasminogen und t-PA führt zur Bildung eines ternären Komplexes, der zu einer Beschleunigung der katalytischen Reaktionsgeschwindigkeit von  $K_M = 63 \mu M$  auf  $K_M = 20$  bis  $200 \text{ nM}$  für den ternären Komplex führt (Fischer, 1992). Die lateralen

Methylgruppen und die negativ geladenen Carboxylgruppen der carboxyterminalen Lysine bilden ideale zwitterionische Bedingungen für die Interaktion mit den ionischen und hydrophoben Bereichen der Kringeldomänen des Plasminogens. Die Bedeutung der Plasminogenaktivierung durch u-PA ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es kommt jedoch zu einer Erhöhung der Plasminogenaktivierungsrate nach Bindung der Prourokinase durch Zelloberflächen-assoziierte Rezeptoren von Monozyten (Blasi, 1988) und verschiedenen endothelialen Zelltypen (Barnathan *et al.*, 1990). Bei unterschiedlichen eukaryotischen Zellen wurde gezeigt, dass Rezeptor-gebundenes Plasminogen schneller aktiviert wird als das freie Plasminogen des Plasmas (Miles und Plow, 1985; Plow *et al.*, 1986). Das Substratspektrum von aktiviertem Plasmin umfasst verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) wie z. B. Fibronectin, Laminin und Vitronectin sowie einige matrixdegradierende Proteasen wie z.B. Kollagenasen (Wong *et al.*, 1992).

Bereits 1933 wurden Studien veröffentlicht, in denen die Fähigkeit von Gram-positiven Bakterien, die fibrinolytische Aktivität des humanen Plasmin(ogen)s zur Gewebekolonisierung zu nutzen, diskutiert wird (Tillet und Garner, 1933). Ein erster Hinweis war die Beobachtung, dass an Zelloberflächen-gebundenes, aktiviertes Plasmin eine erhöhte proteolytische Aktivität aufwies. Dies wurde auch für die Plasminaktivität nach Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Laminin und Vitronectin (Duval-Jobe und Parmely, 1994; Gonzales-Gronow *et al.*, 1991) und für die plasminvermittelte Aktivierung matrixdegradierender Proteasen wie Kollagenasen beschrieben (Wong *et al.*, 1992). 1996 konnte erstmals gezeigt werden, dass der prokaryotische 48 kDa Plasminogenrezeptor Streptokinase den Invasionsprozess der pyogenen Streptokokken durch das Gewebe fördert (Christensen *et al.*, 1996). Des weiteren wurde für den Plasminogenaktivator Pla von *Yersinia pestis* eine essentielle Funktion im Invasionsprozess der Pesterreger in humane Epithelzellen nachgewiesen (Lahteenmaki *et al.*, 2001). Während die Streptokinasen, die Staphylokinasen und Pla nach Plasminogenbindung als bakterielle Aktivatoren auch die Prozessierung zu Plasmin bewirken können, zeigten die Ergebnisse eines Proteasetests mit dem Chromophor D-Val-Leu-Lys-p-Dinitroanilid (S-2251), dass zur Plasminogenaktivierung durch das Eno-Protein von Pneumokokken ein weiterer Aktivator notwendig ist.

Nach einem theoretischen Modell erfolgt nach der Bindung von Plasminogen an einen Rezeptor die Ausbildung eines ternären Komplexes mit einem physiologischen

Plasminogenaktivator, welcher die Aktivierung zu Plasmin bewirkt (Lottenberg *et al.*, 1994). Hierbei erhöht die Präsentation des gebundenen Plasminogens die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion mit den physiologischen Aktivatoren t-PA und u-PA. Hinweise für die Nutzung dieses Plasminogenaktivierungsweges konnten sowohl für Gram-positive Mikroorganismen, wie Gruppe A, C und G-Streptokokken als auch für Gram-negative Bakterien wie *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli* und *Borrelia burgdorferi* gezeigt werden. (Lottenberg *et al.*, 1992 und 1994; Ullberg *et al.*, 1989; Parkkinen und Korhonen, 1989; Kuusela *et al.*, 1992). Damit könnte auch die Plasminogen-Eno-Interaktion dazu führen, dass das an Eno-gebundene Zymogen in einer Form präsentiert wird, die schneller von Plasminogenaktivatoren gebunden und prozessiert wird.

Das Plasminogensystem unterliegt einer komplexen und vielschichtigen Regulation, die einer excessiven unkontrollierten Gewebedegradation entgegenwirkt. So wird die Aktivierung von Plasminogen über die Plasminogenaktivatoren reguliert, die ihrerseits von Plasminogenaktivatorinhibitoren (PAI's) inhibiert werden (Loskutoff, 1991). Neben Antithrombin, dem C1-Inhibitor und  $\alpha_1$ -Antitrypsin, gehören PAI-Proteine zur Familie der Serinproteaseinhibitoren des humanen Plasmas, die auch als Serpine bezeichnet werden, und regulierend in Fibrinolyse, Zellerneuerung und Komplementaktivierung eingreifen. Der in humanem Plasma dominierende Plasminogenaktivatorinhibitor ist das Glykoprotein PAI-1 (52 kDa), das von Endothelzellen und der Leber sekretiert wird (Loskutoff, 1991). PAI-1 zirkuliert gebunden an t-PA oder Vitronektin im Plasma und inhibiert die monomere und die dimere Form des t-PA sowie dimeres u-PA. Während PAI-1 Zelloberflächen-gebundenes u-PA effektiv inhibiert, zeigt es keine Hemmwirkung bei Fibrin-t-PA-Komplexen (Anglés-Cano, 1994). Eine zehnfach schwächere Inhibitionsrate zeigt PAI-2, ein Plasminogenaktivatorinhibitor, dessen Funktion im Ablauf der physiologischen Fibrinolyse noch unklar ist (Anglés-Cano, 1994). Eine weitere Regulation des bereits aktivierten Plasmins erfolgt über spezifische Plasmininhibitoren wie  $\alpha_2$ -Antiplasmin (Collen, 1975a).  $\alpha_2$ -Antiplasmin ist ein monomeres Glykoprotein (70 kDa) mit sehr hoher Inhibitionsrate ( $2-4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Die Interaktion zwischen  $\alpha_2$ -Antiplasmin und Plasmin erfolgt sowohl im carboxyterminalen Strukturbereich des Inhibitors und der Lysinbindungsstelle der ersten Kringeldomäne am Plasmin, sowie zwischen den katalytisch aktiven Domänen beider Enzyme. Die Bindung von Plasmin(ogen) an Fibrin oder Zelloberflächen

verhindert eine Plasmininhibition durch  $\alpha_2$ -Antiplasmin (Rouy und Anglés-Cano, 1990). Die Bindung von Plasmin(ogen) an die Bakterienoberfläche von *Borellia burgdorferi* schützt ebenfalls vor Proteolyse durch  $\alpha_2$ -Antiplasmin (Fuchs *et al.*, 1994). Eine Vielzahl weiterer Proteaseinhibitoren wie  $\alpha_2$ -Makroglobulin greifen u.a. durch eine Rezeptor-vermittelte Endozytose komplexer Proteasen (Chu und Pizzo, 1994) inhibierend in den Fibrinolyseprozess ein.

#### 4.3.1 Plasminogen-Rezeptor-Interaktion

Die Interaktion zwischen Plasminogen und den Bindungsliganden erfolgt in der Regel über die Lysinbindungsstellen innerhalb der Kringeldomänen und den carboxyterminal positionierten Lysinen des Liganden (Wistedt *et al.*, 1998). Die Kringeldomänen eins und fünf weisen darüber hinaus Bindungseigenschaften an Proteine und Lysinanaloga auf, die keine exponierten Carboxygruppe enthalten. Die biochemischen Grundlagen dieser „Pseudo-Lysin-Interaktionen“ sind bislang unbekannt (Wistedt *et al.*, 1998). Zur detaillierteren Analyse der Interaktionen zwischen Plasminogen oder einzelner seiner Domänen mit Liganden werden kleine synthetisch hergestellte Lysinstrukturanaloga wie 6-Aminohexansäure (EACA) und trans-(Aminomethyl)zyklohexancarboxyl Säure (t-AMCHA) verwendet. Die Affinität von EACA zu der ersten N-terminal gelegenen Kringeldomäne ist am stärksten und am schwächsten zur dritten Kringeldomäne:  $K1 > K2 \cong K4 > K5 > K3$  (Novokhatny *et al.*, 1989; Matsuka *et al.*, 1990). Diese Abstufung in der Bindungsaffinität ist ähnlich jedoch nicht identisch im Vergleich zu physiologischen Bindungspartnern wie Fibrin. Für intaktes Fibrin konnte gezeigt werden, dass die fünfte Kringeldomäne mit stärkster Affinität bindet, während Kringel vier die schwächste Interaktion mit Fibrin vermittelt (Lucas *et al.*, 1983; Wu *et al.*, 1990). Bindungsstudien mit Plasminogenfragmenten führten zu dem Ergebnis, dass die spezifische Bindung an eukaryotische Zellen hauptsächlich durch die ersten drei Kringeldomänen des Plasminogens vermittelt wird (Miles *et al.*, 1988). Während die zweite Kringeldomäne eine im Vergleich zur ersten Kringeldomäne geringe Affinität zu Lysinanaloga aufweist, ist sie maßgeblich an der Interaktion mit dem Plasminogenbindungsprotein PAM, einem M-like-Protein von *Streptococcus pyogenes*, beteiligt (Wistedt *et al.*, 1998).

In Inhibitionsstudien konnte eine konzentrationsabhängige Inhibition der Bindung von radioaktiv markiertem Plasminogen an *Streptococcus pneumoniae* durch Glu-Plasminogen und dem um 5 kDa aminoterminal verkürzten Lys-Plasminogen gezeigt werden. Die Kringeldomänen 1-3 führten in steigender Konzentration ebenfalls zur Inhibition der Plasminogenbindung an Pneumokokken. Durch die Inhibitionsstudien konnte die Bindungsinteraktion zwischen der Bakterienoberfläche und dem Plasminogenmolekül auf die ersten drei Kringeldomänen eingegrenzt werden. Die dritte Kringeldomäne enthält eine funktionslose Lysinbindestelle, in der das zweite Aspartat durch ein Lysin ersetzt wurde. Durch diese Substitution geht die negative Ladung in diesem anionischen Bereich verloren und steht nicht mehr für die Interaktion mit den kationischen Aminogruppen des Liganden zur Verfügung (Bürgin und Schaller, 1999). Dies deutet daraufhin, dass besonders die ersten zwei Kringeldomänen eine wichtige Funktion in der Interaktion von Plasminogen mit Oberflächenrezeptoren der Pneumokokken ausüben. Die Inhibition der Plasminogenbindung von Pneumokokken durch das synthetischen Substratanalogon EACA war ein Hinweis darauf, dass die Plasminogenbindung über Interaktion der Lysinbindestellen der Kringeldomänen mit exponierten Lysinen der Rezeptoren auf der Pneumokokkenoberfläche stattfindet.

#### **4.3.2 Die Funktion carboxyterminaler Lysine in der Plasminogenbindung**

Die Interaktion der Lysinbindestellen der Kringeldomänen wird bei eukaryotischen Zellen durch carboxyterminale Lysine vermittelt (Redlitz *et al.*, 1995; Plow und Miles, 1990). Inhibitionsversuche mit Lysinanaloge zeigten, dass auch die carboxyterminalen Lysine der humanen Enolasen eine wichtige Funktion in der Plasminogenbindung ausüben. Die proteolytische Spaltung der endständigen Lysine durch Carboxypeptidase B führte zu einem Verlust der Bindungsaktivität der humanen Enolase (Miles *et al.*, 1991, Felez *et al.*, 1996). Die Aminosäuresequenzen der Enolasen Gram-positiver und Gram-negativer Enolasen weisen carboxyterminale Lysine auf. Das SEN-Protein von Gruppe A-Streptokokken, die Enolase von *Listeria monocytogenes* und auch das Eno-Protein von *S. pneumoniae* weisen zwei carboxyterminale Lysine auf (Tab. 4). Im Blot-overlay unter reduzierenden Bedingungen konnte für das rekombinante Eno-Protein der Pneumokokken nach

spezifischer Abspaltung der carboxyterminalen Lysine durch die Carboxypeptidase B nahezu keine Plasminogenbindungsaktivität nachgewiesen werden. Des weiteren zeigten Eno-Proteine, deren carboxyterminale Lysine durch positionsspezifische Mutagenese deletiert oder zu Leucinen substituiert worden waren, unter reduzierenden Bedingungen ebenfalls keine Bindung mehr von Plasminogen. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls für das SEN-Protein von *S. pyogenes* beschrieben und deuten an, dass die carboxyterminalen Lysine von Eno eine wichtige Funktion in der Plasminogenbindung übernehmen. Um diese Ergebnisse auch in Bindungsversuchen unter nativen Bedingungen zu bestätigen, wurden Blot-overlay-Studien unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Während das Eno-Protein im nativen SDS-Gel als konkrete Proteinbande aufgetrennt werden konnte, zeigten die carboxyterminal-modifizierten Proteine ein diffuses Laufverhalten. Die Modifikation der carboxyterminalen Lysine scheint zu einem Verlust der strukturellen Integrität des Proteins zu führen, wodurch eine Bindungsanalyse im Blot-overlay unter nativen Bedingungen nicht möglich war. Die Untersuchungen zur Interaktion der modifizierten Eno-Proteine im Vergleich zum Wildtyp-Protein in der Dot-Spot-Analyse zeigte im Gegensatz zu den Beobachtungen im Blot-overlay eine Bindung von Plasminogen an Eno<sup>del</sup>, Eno<sup>LL</sup> und Eno<sup>KL</sup>. Dieses Ergebnis war ein erster Hinweis darauf, dass unter nicht-reduzierenden Bedingungen neben den carboxyterminalen Lysinen eine weitere Domäne für die Interaktion mit Plasminogen essentiell ist.

In Bindungsversuchen mit radioaktiv markiertem Plasminogen zeigten Pneumokokken nach Reassoziations von Eno-Protein an die bakterielle Oberfläche eine höhere Plasminogenbindungsaktivität. Die Plasminogenbindungsstudien, in denen die carboxyterminal modifizierten Eno-Proteine zur Reassoziations an die Oberfläche von *S. pneumoniae* verwendet wurden, zeigten ebenfalls einen Anstieg der Plasminogenbindung an Pneumokokken. Diese Resultate bestätigten die Vermutung, dass in der nativen Molekülkonformation nicht allein die terminalen Lysine des Eno-Proteins zur Plasminogenbindung beitragen.

Die Generierung von Pneumokokkenmutanten, die ein carboxyterminal deletiertes Eno-Protein exprimierten, ermöglichte die Untersuchung der Plasminogenbindungsaktivität im Vergleich zum Wildtyp-Stamm. Im Plasminogen-Blot-overlay unter reduzierenden Bedingungen konnte für die carboxyterminal deletierte Eno der Pneumokokken keine Plasminogenbindung festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte diese Mutante im Bindungsversuch mit radioaktiv markiertem Plasminogen

eine Bindungsaktivität, die der des Wildtyp-Stammes entsprach. Das Ergebnis dieser Bindungsstudien könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die Plasminogenbindung unter physiologischen Bedingungen nicht allein von den carboxyterminalen Lysinen vermittelt wird. Im Blot-overlay mit radioaktiv markiertem Plasminogen wurden mehrere Proteinbanden detektiert, die eine Plasminogenbindungsaktivität zeigten. Neben der Eno konnten zwei dieser Proteinbanden als Glykolyseenzyme GAPDH und Phosphofruktokinase identifiziert werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass weitere Plasminogenrezeptoren auf der Oberfläche der Pneumokkenmutante im Bindungsversuch zur Plasminogenbindung beigetragen haben.

Die Analyse der Plasminogenbindung an die carboxyterminal modifizierten Eno-Proteine im Vergleich zum Wildtyp-Protein erfolgte in SPR-Kinetikstudien mit Plasminogen, Plasmin und Kringeldomänen 1-3. Die auf den Sensorchips immobilisierten Eno-Proteine Eno, Eno<sup>del</sup>, Eno<sup>KL</sup> und Eno<sup>LL</sup> zeigten in den Kinetikanalysen unabhängig von den Substitutionen oder Deletionen am Carboxylterminus eine Bindung an die drei verwendeten Analyte. Dieses Ergebnis war ein weiterer Hinweis auf die Existenz eines weiteren Bindungsmotivs im Eno-Protein. Im Gegensatz zu den eukaryotischen Enolasen, in denen die carboxyterminalen Lysine massgeblich die Plasminogeninteraktion vermitteln (Redlitz *et al.*, 1995), wiesen bereits die Ergebnisse aus Scatchard-Analysen auf eine Beteiligung mehrerer Bindungsstellen an der Plasminogenbindung der Enolase SEN von *S. pyogenes* hin (Pancholi und Fischetti, 1998).

Für die Auswertung der Kinetikanalysen stellt die Evaluierungssoftware mehrere Bindungsmodelle zur Verfügung. Das bivalente Analyt-Modell ist eine Kinetik, die z.B. für Interaktionen zwischen Antikörpern und Proteinen Anwendung findet. Dieses Modell beschreibt die Interaktion zwischen einem Analyten mit zwei Bindungsstellen und einem Liganden mit einer Bindungsstelle. Die verschiedenen Lysinbindungsstellen in den Kringeldomänen des Plasminogens stellen mehrere potentielle Interaktionspartner dar. Die bisherigen Bindungsstudien mit den modifizierten Eno-Proteinen wiesen darauf hin, dass es sich bei Eno nicht um einen monovalenten Liganden handelt. Daher ist das bivalente Reaktionsschema nicht das adäquate Evaluierungsmodell. Das Zwei-Phasenmodell unterstellt eine Konformationsänderung des gebildeten Komplexes. Für Bindungsereignisse mit Plasminogen wurden Konformationsänderungen beschrieben. Da dieses Modell jedoch nicht die

Möglichkeit multipler Bindungsstellen berücksichtigt, ist es für eine Evaluierung der Kinetikparameter nicht geeignet. Da vorangegangene Studien darauf hinwiesen, dass neben den carboxyterminalen Lysinen von Eno weitere Bindungsmotive die Interaktion mit Plasminogen vermitteln, wurde das heterogene Liganden-Bindungsmodell zur Evaluierung ausgewählt. Dieses Modell berücksichtigt eine Interaktion von zwei Bindungsstellen am Liganden mit dem Analyten in voneinander unabhängigen Reaktionen und ermöglichte die Bestimmung der Geschwindigkeits- und der Gleichgewichtskonstanten und den Vergleich mit bekannten Werten für die Enolase-Plasminogen-Interaktion verschiedener Organismen. So wurde für die Interaktion von eukaryotischen Enolasen mit Plasminogen eine Gleichgewichtskonstante im Bereich zwischen 0,1 und 4  $\mu\text{M}$  angegeben (Andronicos *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu lagen die  $K_D$ -Werte der Plasminogeninteraktion der Bindungsproteine von Gruppe A, C und G-Streptokokken im Bereich von 20 nM und 80 nM (Ullberg *et al.*, 1989; Eberhard *et al.*, 1999). In Scatchard-Analysen zur Interaktion von SEN mit radioaktiv markiertem Plasminogen deutete ein nicht-linearer Kurvenverlauf die Beteiligung von zwei Bindungsstellen im SEN-Protein an der Plasminogenbindung an. Es konnten zwei Gleichgewichts-konstanten  $K_{D1}$  mit 1,3 nM und  $K_{D2}$  mit 7,4 nM bestimmt werden (Pancholi und Fischetti, 1998). Die Bindungsstudien der SEN-Plasmin-Interaktion zeigten ebenfalls zwei Bindungsereignisse mit  $K_D$ -Werten von 2,2 nM und 27 nM, die auf eine geringere Bindungsaffinität hindeuteten (Pancholi und Fischetti, 1998). Für die Interaktion zwischen Eno und Plasminogen wurden nach dem heterogenen Modell ebenfalls zwei Gleichgewichtskonstanten bestimmt:  $K_{D1}$ : 0,55 nM bzw.  $K_{D2}$ : 86,2 nM. Die Konzentration von Plasminogen im humanen Plasma beträgt 1,6  $\mu\text{M}$  (Rabiner *et al.*, 1969). Die Werte der Gleichgewichtskonstanten lagen somit in der Größenordnung für Bindungsereignisse in physiologisch relevanten Interaktionen.

Grundlage für die Evaluierung der Kinetikdaten mit der BIAcore-Software ist der Marquardt-Levenberg-Algorithmus. Dieser Algorithmus optimiert Parameterwerte durch Minimierung der Flächensummen bei fehlender Übereinstimmung der Sensorgramme zwischen den experimentellen und den errechneten Werten. Studien zur Bewertung dieses Algorithmus haben gezeigt, dass sich das heterogene Bindungsmodell zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten nur unter der Voraussetzung eignet, dass sich die Werte der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{a1} / k_{d1}$  und  $k_{a2} / k_{d2}$  mindestens um den Faktor 2 voneinander unterscheiden (Khalifa *et al.*,



2001). Die ermittelten Konstanten für die Bindung von Eno an Plasminogen betrugen  $8,74\text{e}^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für  $k_{a1}$  und  $4,83\text{e}^{-7} \text{ s}^{-1}$  für  $k_{d1}$  bzw.  $1,55\text{e}^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für  $k_{a2}$  und  $1,33\text{e}^{-2} \text{ s}^{-1}$  für  $k_{d2}$  (Tab. 1). Die Differenz der Datenpaare war ausreichend für eine Kintikanalyse nach dem heterogenen Bindungsmodell. Für die Interaktion von Eno<sup>LL</sup> und Eno<sup>del</sup> mit Plasminogen wurden Geschwindigkeitskonstanten von  $6,09\text{e}^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für  $k_{a1}$  und  $4,79\text{e}^{-5} \text{ s}^{-1}$  für  $k_{d1}$  bzw.  $6,02 \text{e}^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für  $k_{a2}$  und  $4,71\text{e}^{-5} \text{ s}^{-1}$  für  $k_{d2}$  ermittelt (Tab. 1). Die Unterschiede zwischen den Geschwindigkeitskonstanten  $k_{a1} / k_{d1}$  und  $k_{a2} / k_{d2}$  waren zu gering, um eine Berechnung der Kinetikparameter nach dem heterogenen Modell durchführen zu können. Daher konnte dieses Modell nicht zur Evaluierung der Interaktion von Eno<sup>LL</sup> bzw. Eno<sup>del</sup> mit Plasminogen verwendet werden.

Die Bewertung der Kinetikanalyse nach dem heterogenen Liganden-Bindungsmodell ergab, dass hohe  $\chi^2$  - Werte und große Abweichungen der berechneten Kinetikdaten von den tatsächlich gemessenen Daten keine Analyse der Interaktion von Eno mit Plasmin ermöglichen. Die serinproteolytische Aktivität des Plasmins führte zu einer Spaltung des immobilisierten Liganden auf der Sensorchipoberfläche und ergab daher ungenaue Kinetikdaten. Die Kinetikevaluierung der Kringel 1-3-Bindung an die unterschiedlichen Eno-Proteine zeigte ebenfalls hohe Abweichungen bei der Verwendung des heterogenen Liganden-Bindungsmodells. Die Betrachtung der einzelnen dynamischen Kinetikparameter der Plasminogeninteraktion mit den unterschiedlichen Eno-Proteinen ergab, dass das heterogene Bindungsmodell nur eine Annäherung an die tatsächliche Bindungssituation ist. Dieses Modell zeigte besonders in der Dissoziationsphase keine vollständige Übereinstimmung zu den tatsächlich gemessenen Interaktionen. Daher erfolgte eine separate Analyse der Dissoziationsphase. Aufgrund der vorangegangenen Analysen wurden mindestens zwei unterschiedliche Dissoziations-ereignisse vermutet, die unter Verwendung eines Mehr-Komponenten-Dissoziationsmodells untersucht werden sollten (Andronicos *et al.*, 2001). Dieses Modell wurde bereits zur Analyse der Plasminogeninteraktion der eukaryotischen  $\alpha$ -Enolase verwendet und berücksichtigt zwei Dissoziations-ereignisse, die durch Konformationsänderung oder durch mehrere unabhängige Bindungsreaktionen hervorgerufen werden.

Die Analyse der Interaktion von den verschiedenen Eno-Proteinen mit Plasminogen unter Verwendung der SPR-Technik bestätigte, dass es sich um eine komplexe Interaktion handelt, die mehrere unabhängige Bindungsereignisse und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch eine Konformationsänderung am Plasminogenmolekül

beeinhaltet. Die SPR-Technik ermöglichte die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten und einen Bindungsvergleich der verschiedenen modifizierten Eno-Proteine mit dem Wildtyp-Protein. Eine detaillierte Analyse der Bindungsdynamik war jedoch mit den Evaluierungsalgorithmen der BIAcore-Software aufgrund der komplexen Bindungsinteraktion selbst nach manueller Ergänzung weiterer Parameter nicht möglich.

#### 4.4 Interaktion des internen Bindungsmotivs mit Plasminogen

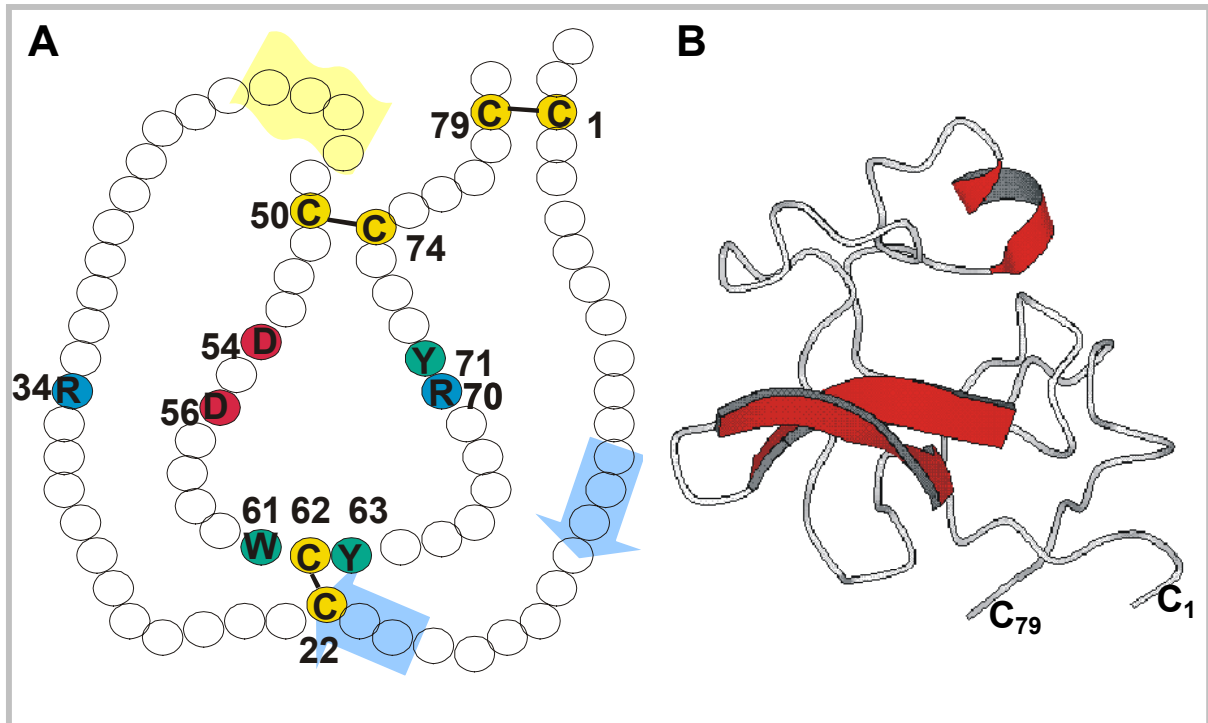
Die Ergebnisse der Bindungsstudien und die Kinetikanalysen gaben deutliche Hinweise darauf, dass neben den carboxyterminalen Lysinen weitere Bindungsstellen im Eno-Protein die Bindung an Plasminogen vermitteln. In Spot-Membran-Analysen wurde die gesamte Aminosäuresequenz von Eno auf weitere Plasminogenbindungsmotive überprüft. Die Ergebnisse der Blot-overlay Studien mit Plasminogen zeigten, dass ein Nonapeptid mit der Aminosäureabfolge FYDKERKVY spezifisch mit Plasminogen reagierte. Diese 9 Aminosäuren befinden sich an den Positionen 248 bis 256 des Eno-Proteins und konnten in identischer Abfolge auch in der Enolase von der *S. intermedius* und der SEN aus *S. pyogenes* nachgewiesen werden.

In Bindungsversuchen mit einem synthetisch hergestellten Peptid mit der Aminosäuresequenz FYDKERKVYD der internen Plasminogenbindungssequenz von Eno wurde die Plasminogenbindungsaktivität von Pneumokokken konzentrationsabhängig inhibiert. Dieses Ergebnis bewies die wichtige Funktion der internen Bindungsregionen von Eno für die Interaktion von Plasminogen mit Pneumokokken. In einer Datenbanksuche konnten keine homologen Sequenzen zu dem getesteten synthetischen Peptid im translatierten Genom von *Streptococcus pneumoniae* identifiziert werden. Um die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren des internen Bindungsmotivs für die Plasminogenbindung bestimmen zu können, wurden systematische Substitutionen von jeder Aminosäure des Motivs mit den 20 möglichen Aminosäuren durchgeführt. Die Ergebnisse der anschließenden Spot-Membran-Analyse zeigten, dass die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin und besonders die negativ geladenen Glutamin- und Asparaginsäuren essentiell für die Plasminogenbindung sind. Im Gegensatz dazu zeigten auch nicht-

konservative Aminosäureaustausche an den Positionen der Lysine nahezu keine Auswirkung auf die Plasminogenbindungsaktivität der Peptide. Diese Ergebnisse deuteten an, dass die Interaktion des internen Bindungsmotivs von Eno mit Plasminogen im Gegensatz zu der carboxyterminal vermittelten Bindung Lysin-unabhängig erfolgte. Bei dieser Bewertung ist zu berücksichtigen, dass in der Spot-Membran-Analyse das Bindungsverhalten kleiner Peptide aus bis zu 15 Aminosäuren untersucht wird. Diese Peptide werden auf der Nitrozellulose-Membran immobilisiert. Mit dieser Methode können daher keine strukturabhängigen Interaktionen oder Bindungsereignisse, die bestimmte Molekülkonformationen erfordern, erfasst werden. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Lysine des internen Bindungsmotivs unter physiologischen Bedingungen zur Plasminogenbindungsaktivität beitragen.

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Kringeldomänen ist seit längerem Bestandteil struktureller Untersuchungen. So erfolgte bereits die Röntgenstrukturanalyse der Kringeldomänen 1, 4 und 5 von humanem Plasminogen (Wu *et al.*, 1991 und 1994; Mathews *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1998; Mulichak *et al.*, 1991), der Kringeldomäne 2 von t-PA (de Vos *et al.*, 1992), den Domänen Kringel 1 und 2 von Prothrombin aus Rindern (Arni *et al.*, 1993; Seshadri *et al.*, 1991) sowie dem 37sten Kringelmotiv des Apolipoproteins (Mikol *et al.*, 1996). Des Weiteren liegen Kernspin-Magnet-Resonanz-(NMR-) Daten für die Kringeldomänen 1 und 4 des humanen Plasminogen (Atkinson und Williams, 1990; Rejante und Llinás, 1994) und Kringel 4 des Plasminogens von Pferden (Cox *et al.*, 1994) sowie von der Kringeldomäne der humanen Urokinase und von Kringel 2 von humanem t-PA (Byeon und Llinás, 1991; Li *et al.*, 1994) vor. In Kristallstrukturanalysen von Komplexen aus den Plasminogendomänen Kringel 1 und Kringel 4 mit verschiedenen Lysinanaloga wie EACA und AMCHA (trans-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid), konnten die für die Interaktion essentiellen Aminosäuren identifiziert werden (Mathews *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1991). Die Struktur der Lysinbindungsstellen der Kringeldomänen besteht aus einem ionischen Dipol mit anionischen und kationischen Regionen umrahmt von hydrophoben Bereichen mit aromatischen Aminosäuren (Tulinsky, 1991). In den Kringelmotiven 1 und 4 wird der anionische Bereich aus den Aminosäuren Asp 54 bzw. 55 und Asp 56 bzw. 57 gebildet, während die kationische Region hauptsächlich durch die Aminosäure Arg

70 in Ergänzung zu Arg 34 im ersten Kringelmotiv und Lys 35 im vierten Kringelmotiv repräsentiert wird (Abb. 42A).



**Abbildung 42:**

**A:** Schematische Darstellung der Kringeldomäne 1 des humanen Plasminogens (nach Menhart *et al.*, 1991). Die Aminosäuren der Lysinbindungsstelle sind in rot (saure Aminosäuren), grün (aromatische Aminosäuren) und blau (basische Aminosäuren) dargestellt. Die für die Struktur essentiellen Cysteine sind gelb unterlegt. β-Faltblattstrukturen sind hellblau markiert und α-helicale Bereiche sind hellgelb unterlegt. **B:** Tertiärstruktur der Kringeldomäne 1 nach Röntgenkristallstruktur-Analyse. β-Faltblattstrukturen und α-helicale Bereiche sind in rot gezeichnet.

Die Distanz zwischen Arg 70 und Asp 56 korreliert mit dem Abstand der zwitterionischen Ladungen vom Lysin und dem Lysinanalog EACA (Wu *et al.*, 1991). Die ionischen Wechselwirkungen mit dem Liganden werden durch Van-der-Waals-Bindungen ergänzt, die zwischen den aromatischen Aminosäuren in den hydrophoben Abschnitten der Kringeldomänen (Phe 35 / Trp 61 / Tyr 71 des ersten Kringelmotivs bzw. Tyr 39 / Phe 62 / Trp 70 im vierten Kringelmotiv) und den Methylgruppen des Liganden zwischen den ionisch geladenen Aminosäureresten ausgebildet werden (Anglés-Cano, 1994; Bürgin und Schaller, 1999; Abb. 42A). Die Stärke der Bindungsaffinität zwischen Plasminogen und dem Bindungspartner ist abhängig von der Übereinstimmung der Ladungen und Polaritäten der gegenüberliegenden Aminosäuren im Bindungsmotiv. Die Ladungsverteilung im

internen Bindungsmotiv erfüllt die Voraussetzungen für eine Interaktion mit den Lysinbindungsstellen der Kringelmotive. Die aromatischen Tyrosine und das Phenylalanin flankieren die sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat und die positiven Lysine und das Arginin im Zentrum des Bindungsmotivs. Zur detaillierten Aufklärung der Interaktion zwischen den Aminosäuren des internen Bindungsmotivs von Eno und der Lysinbindungsstellen der Kringelmotive sind weitere Strukturanalysen notwendig.

Homologievergleiche dieser internen Aminosäureabfolge mit der Enolasesequenz anderer Gram-positiver und Gram-negativer Mikroorganismen zeigten, dass die Position der aromatischen Aminosäuren hoch konserviert war, während die Aminosäuren dazwischen in der gleichen Abfolge oder konservativ substituiert nur bei Streptokokken-Arten nachgewiesen werden konnten. Diese Ergebnisse sind weitere Hinweise auf die wichtige Bedeutung des internen Plasminogenbindungsmotivs für die Plasminogenbindung der Streptokokken.

Die Darstellung der Oberflächenlokalisation einzelner Aminosäurebereiche des Eno-Proteins aufgrund ihres Hydratisierungsgrads gab bereits deutliche Hinweise darauf, dass sich das interne Bindungsmotiv mit hoher Wahrscheinlichkeit an einer nach außen exponierten Position des Enomoleküls befindet. Um mehr Informationen über die Position und Anzahl der vorhandenen Plasminogenbindungsstellen im Eno-Protein zu erhalten, waren weitere Daten zur Proteinstruktur erforderlich. In Zusammenarbeit mit Stefanie Ehinger und Dr. W.-D. Schubert aus der Abteilung Strukturbioogie von Herrn Dr. D. Heinz erfolgte die Analyse der Kristallstruktur des rekombinanten Eno-Proteins. Die Aufreinigung des Proteins erfolgte im Rahmen der Diplomarbeit von D. Bracht in der Arbeitsgruppe Mikrobielle Pathogenität. Für eukaryotische Enolasen konnte bereits gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Enolasen als Dimer aus zwei identischen antiparallel angeordneten Untereinheiten bestehen, die über Ionenbindung zwischen Glu 20 und Arg 414 miteinander verbunden sind. Während die aus *Escherichia coli* isolierte Enolase als Dimer vorkommt (Spring und Wold, 1971), weist die Enolase aus *Thermus aquaticus* eine oktamere Tertiärstruktur mit einem Molekulargewicht von 350 kDa auf (Stellwagen *et al.*, 1973). Die oktamere Struktur wird in Form eines aus Dimeren angeordneten Tetramers auch von den Enolasen aus *Bacillus megaterium* (Singh *et al.*, 1977), *Bacillus subtilis* (Brown *et al.*, 1998) *Zymomonas mobilis* (Pawluk *et al.*, 1986) und *Streptococcus mutans* (Kaufmann und Bartholmes, 1992) ausgebildet.



**Abbildung 43:**

Darstellung der dimeren Proteinstruktur des Plasmin(ogen)-Bindungsproteins Eno von *S. pneumoniae*. Die Pfeile markieren die Region des internen Bindungsmotivs. Die Magnesiumionen sind als violette Kugeln dargestellt (Zur Verfügung gestellt von S. Ehinger, Abteilung Strukturbiologie der GBF Braunschweig).

Die Strukturanalyse der Enolase von *Streptococcus pneumoniae* ergab, dass es sich bei Eno um ein dimeres Protein aus zwei identischen Untereinheiten handelt (Abb. 43). Im katalytisch aktiven Zentrum der beiden Untereinheiten befinden sich Magnesiumionen. Der Carboxyterminus ist in der Röntgenstrukturanalyse aufgrund fehlender Elektronendichte nicht eindeutig positionierbar. Wahrscheinlich handelt es sich um eine flexible Region des Moleküls. Das interne Bindungsmotiv bildet eine Peptidschleife, die zwei  $\alpha$ -Helices miteinander verbindet und an der Oberfläche des globulären Moleküls positioniert ist. Damit bestätigte die Kristallstrukturanalyse die bereits vermutete exponierte Lokalisation der internen Plasminogenbindungsregion. Des weiteren wurde durch die Strukturaufklärung gezeigt, dass die Bereiche der Plasminogeninteraktion in beiden Untereinheiten vorhanden sind und daher zweifach zur Bindung beitragen können. Kristallstrukturanalysen von Eno und Plasminogen im Komplex können zur endgültigen Aufklärung der Eno- Plasminogen- Interaktion entscheidend beitragen. In Plasminogenbindungsanalysen mit Eno-Proteinen, die

zusätzlich zur Deletion der carboxyterminalen Lysine eine funktionslose interne Bindungsregion aufweisen, können ebenfalls Hinweise zur Relevanz des internen Bindungsmotivs für die Plasminogenbindung gewonnen werden. Die Herstellung rekombinanter Kringelfragmente ermöglicht eine gezielte Bindungsanalyse jedes einzelnen Plasminogenteilfragments und die Bestimmung funktioneller Domänen des Plasminogens.

Versuche mit künstlichen Basalmembranen haben gezeigt, dass die Bindung von Plasminogen und die anschließende Aktivierung zum serinproteolytischen Enzym zu einer gezielten Degradation der Matrix führt. Der Verlust der lokalen, strukturellen Integrität der extrazellulären Matrix erleichtert den Bakterien die Ausbreitung in den Gewebsschichten und beschleunigt damit den Infektionsprozess. Neben der Matrixdegradation kommt es durch die erhöhte Aktivität von Plasmin auch zur verstärkten Auflösung von Fibringerinnenseln und Thromben. Diese Wundverschlüsse sind wichtiger Bestandteil der ersten Abwehr gegen Infektionserreger. Die Plasminogenbindung von *Streptococcus pneumoniae* beschleunigt die Aktivierung zu Plasmin und ermöglicht eine leichtere Überwindung dieser physischen Barriere. In weiterführenden Studien soll die Funktion von Eno bei der Migration von Pneumokokken durch Gewebsschichten im Zwei-Kammer-Modell mit synthetischen Matrigelen bestätigt und näher untersucht werden. Diese Methode ermöglicht auch die Untersuchung der Pneumokokkenmigration durch künstliche Basalmembranen nach einer Reassoziation von Eno an die bakterielle Oberfläche in Anwesenheit von Plasminogen und Plasminogenaktivatoren. In Adhärenzstudien mit Zelllinien, die den Urokinase-Rezeptor exprimieren, soll die Funktion von Eno als bakterielles Adhäsins nach Rekrutierung von Plasminogen untersucht werden. Anti-SEN-Antikörper beschleunigten in *in vitro*-Versuchen die Opsonophagozytose von Gruppe A-Streptokokken (Pancholi und Fischetti, 1998). In weiteren Studien soll die Fähigkeit von anti-Eno-Antikörpern zur Opsonisierung von Pneumokokken mit anschließender verstärkter Phagozytose untersucht werden. Die Enolase von *S. pneumoniae* trägt zur Kolonisierung des pathogenen Erregers im Gewebe bei und kann damit in die Gruppe der Virulenzfaktoren eingeordnet werden. Infektionsstudien am Mausmodell zur Untersuchung des Beitrags von Eno zur Virulenz des Erregers sind geplant. Darüber hinaus können mit diesem Infektionsmodell Hinweise auf einen Eno-vermittelten Immunschutz und auf die Eignung von Eno als Impfstoffkandidat gewonnen werden.

## 5 MATERIAL und METHODEN

### 5.1 Material und Chemikalien

#### 5.1.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Charakteristika / relevanter Genotyp	Referenz / Herkunft
<b>XL1-Blue MRF<sup>+</sup></b>	$\Delta(mcrA)183$ , $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ , $endA1$ , $supE44$ , $thi-1$ , $recA1$ , $gyrA96$ , $relA1$ , $lac[F'proAB lacI^q Z \Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$	(Jerpseth <i>et al.</i> , 1992) / Stratagene
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	$\Delta(lac)U169$ , $endA1$ , $gyrA46$ , $hsdR17$ , $\Phi80\Delta(lacZ)M15$ , $recA1$ , $relA1$ , $supE44$ , $thi-1$	Sambroock <i>et al.</i> , 1989
<b>Top10F<sup>+</sup></b>	F <sup>+</sup> , ( $lacI^q$ , Tn10, Tet <sup>R</sup> ), $mcrA$ , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ , $\Phi80 lacZ \Delta M15$ , $\Delta lacX74$ , $recA1$ , $deoR$ , $araD139$ , $\Delta(ara-leu)7697$ , $galU$ , $galK$ , $rpsL$ (Str <sup>R</sup> ), $endA1$ , $nupG$	Invitrogen, 1994
<b>M15 (pREP4)</b>	<i>E. coli</i> mit Repressorplasmid pREP4 (kan <sup>R</sup> ); das den lac-Repressor konstitutiv exprimiert	Qiagen, Hilden

**Tabelle 6:** Verwendete *Escherichia coli*- Stämme.

Stammbezeichnung	relevante Charakteristika	Referenz / Herkunft
<i>S. pneumoniae</i> <b>R6x</b>	Kapselloses Derivat von D39	Avery et al., 1944
<i>S. pneumoniae</i> <b>ATCC 11733</b>	bekapselt, Serotyp 2	ATCC
<i>S. pyogenes</i> (Gr. <b>A</b> )/A11	Rachenisolat	Giessen
<i>S. pyogenes</i> (Gr. <b>A</b> )/A158	NS 342	Australien

**Tabelle 7:**

Verwendete Bakterien-Stämme der Gattung Streptococcus.

Alle weiteren Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Anhang aufgeführt.

#### 5.1.2 Kulturmedien

Die angegebenen Medien wurden vor Gebrauch im Autoklaven 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Vor Zusatz von Glucose oder Antibiotika wurden diese sterilfiltriert.

##### 5.1.2.1 Nährmedien und Kulturbedingungen für *S. pneumoniae*-Stämme

Die Pneumokokken-Stämme wurden zunächst von der Glycerol-Stammkultur auf Blutagarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Für die Anzucht in



Flüssigkultur wurde Todd-Hewitt-Nährmedium mit 5 % Hefeextrakt (THY) verwendet. Die Kultur erfolgte mikroaerophil bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

**Blutagarplatten (Merck):** 23,0 g Pepton, 5,0 g NaCl, 14,0 g Agar agar, 65 ml Hammelblut, pH 7.4

**THY-Medium:** Todd-Hewitt-Broth (36,4 g/l), 0,5 % Hefeextrakt (Oxoid)

**CpH8-Medium (nach Adams und Roe, 1945; Lacks und Hotchkiss, 1960):**

Das CpH8-Medium ist ein semi-synthetisches Komplettmedium, das vorwiegend für die Kultur der Pneumokokken zur Transformation verwendet wurde. Ein Liter des CpH8-Mediums besteht aus 800 ml PreC, 26 ml Supplement, 20 ml Glutamin (0,1 %), 20 ml Adams III, 10 ml Natriumpyruvat (2 %), 30 ml Phosphatpuffer, pH 8.0, 18 ml Hefeextrakt (5 %).

#### Zusammensetzung der Einzelkomponenten

PreC:	1,208 g Natrium-Acetat, 5 g Caseinhydrolysat, 5 mg L-Tryptophan, 5 mg L-Casein, ad 1 l H <sub>2</sub> O, pH 7.5 mit NaOH
Adams III:	160 ml Adams I, 40 ml Adams II, 2 g L-Asparagin, 200 mg Cholin-HCl, 17 mg CaCl <sub>2</sub>
Supplement:	60 ml "3 in 1"-Salze, 120 ml Glukose (20 %), 6 ml Saccharose (50 %), 120 ml Adenosin (2 mg ml <sup>-1</sup> ), 120 ml Uridin (2 mg ml <sup>-1</sup> )
Phosphatpuffer:	53 ml K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1M), 947 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1M)

#### Zusätze der Einzelkomponenten

Adams I:	0,15 mg Biotin, 150 mg Nikotinsäure, 175 mg Pyridoxin-HCl, 600 mg Ca-Pantothenat, 160 mg Thiamin-HCl, 70 mg Riboflavin, ad 1 l H <sub>2</sub> O
Adams II:	500 mg FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, 500 mg CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O, 500 mg ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, 200 mg MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O, 10 ml HCl konz., ad 1 l H <sub>2</sub> O
"3 in 1"-Salze:	100 g MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, 500 mg CaCl <sub>2</sub> , 3,3 mg MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O, ad 1 l H <sub>2</sub> O

#### 5.1.2.2 Nährmedien und Kulturbedingungen für *E. coli*-Stämme

*E. coli* Bakterien wurden in LB-Medium unter Schütteln bei 37°C angezogen. Als Festmedium wurden LB-Bactoagarplatten verwendet.

**LB-Medium:** 1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, pH 7.5  
(Luria- Bertani)

**Bacto-Agarplatten:** LB-Medium + Bacto-Agar (1,5%)

**SOB-Medium:** 2 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM

**SOC-Medium:** MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 2,5 mM KCl  
 SOB-Medium mit 20 mM Glucose

### 5.1.3 Stammhaltung von Bakterien

Die Aufbewahrung der Bakterien war auf mit Parafilm abgedichteten Agarplatten im Fall der *E. coli* bei 4°C und im Fall der Pneumokokken bei Raumtemperatur für einige Tage bis Wochen möglich. Für die Aufbewahrung über längere Zeiträume wurden Glycerol-Kulturen angelegt und diese bei –80°C eingefroren.

### 5.1.4 Plasmide

Plasmide	Größe (kb)	Selektionsbedingungen	Referenz
pCR2.1	3,9	Amp (50 µg ml <sup>-1</sup> ), Km (50 µg ml <sup>-1</sup> )	Invitrogen, 1994
pQE30	3,4	Amp (100 µg ml <sup>-1</sup> )	Qiagen
pJDC9	6,95	Ery (120 µg ml <sup>-1</sup> bzw. 3-7 µg ml <sup>-1*</sup> )	Chen, Morrison, 1988

**Tabelle 8:**

Verwendete Plasmide; die mit \* markierten Selektionsbedingungen beziehen sich auf *S. pneumoniae*, alle übrigen auf *E. coli*.

### 5.1.5 Oligonukleotide für die PCR und für die Sequenzierung

Die Oligonukleotide für die PCR wurden von der Firma Gibco bezogen. Sie wurden in 1 ml ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und zur in Konzentrationen zwischen 5 pmol und 50 pmol/µl eingesetzt. Die Primersequenz wurde so gewählt, dass die Länge der Primer und der Gehalt an GC- bzw. AT-Paaren ein Annealing zwischen 55°C und 70°C ermöglicht.

Bezeichnung	Länge [bp]	Sequenz	Position
SB18	26 →	5' <u>ATGTCAATTATTACTGATGTTTACGC</u> 3'	1-26
SB19	28 ←	5' <u>TTATTTTTTAAGGTTGTAGAATGATTTC</u> 3'	1305-1277
SB20 ( <i>Bam</i> HI)	38 →	5'(GC) <sub>6</sub> <u>GGATCCT</u> TTGTCAATTATTACTGATGTTTACG C 3'	1-26
SB21 ( <i>Bam</i> HI)	34 →	5'(GC) <sub>6</sub> <u>GGATCCCC</u> ATCAGGAGCTTCTACTGGTG 3'	111-133
SB22 ( <i>Hind</i> III)	33 ←	5'(GC) <sub>6</sub> <u>AAGCTT</u> TTATTTTTTAAGGTTGTAGAATGATT TC 3'	1305-1277

**Tabelle 9:**

Oligonukleotide zur PCR-Amplifizierung und Expressionsklonierung des eno-Genabschnitts. Restriktionsschnittstellen sind kursiv dargestellt (Start bzw. Stop-Codons sind unterstrichen).

Bezeichnung	Länge [bp]	Sequenz	Position
<b>SB29</b>	24 ←	5'CGCACCCAATTTACCTTTGTTAGG 3'	324-301
<b>SB45 (<i>HindIII</i>)</b>	44 ←	5'(GC) <sub>6</sub> <b><i>AAGCTTT</i></b> TA__AAGGTTGTAGAATGATTTCAA TC 3'	1305-1273
<b>SB47 (<i>HindIII</i>)</b>	50 ←	5'(GC) <sub>6</sub> <b><i>AAGCTTT</i></b> TATTTCAAAAGGTTGTAGAATGATT TCAATC 3'	1305-1273
<b>SB48 (<i>HindIII</i>)</b>	22 ←	5'(GC) <sub>6</sub> <b><i>AAGCTTT</i></b> TACAACAAAAGGTTGTAGAATGAC AATC 3'	1305-1273
<b>SB50</b>	22 →	5'GAAGCTGCTGGATATGTACCAG 3'	679-701
<b>SB51</b>	22 →	5'AGTACAACCTTGTGGTGACGAC 3'	936-958
<b>SB52</b>	22 ←	5'CTGGTACATATCCAGCAGCTTC 3'	701-679

**Tabelle 10:**

Oligonukleotide zur Mutagenese des carboxyterminalen Bereichs. Restriktionschnittstellen sind kursiv dargestellt (substituierte Nukleotide bzw. deletierte Sequenzabschnitte sind unterstrichen).

Bezeichnung	Länge [bp]	Sequenz
<b>SB49</b>	36 →	(GC) <sub>6</sub> AAG CTT AAT TAG CTG AGC TTG GAC
<b>QP1b</b>	26 →	CAT AAA AAA TTT ATT TGC TTT GTG AG
<b>QP2</b>	22 ←	GTT CTG AGG TCA TTA CTG GAT C
<b>M13</b>	16 →	GTA AAA CGA CGG CCA G
<b>M13 reverse</b>	17 ←	CAG GAA ACA GCT ATG AC

**Tabelle 11:**

Oligonukleotide zur Sequenzanalyse und zur Mutagenese für die Plasmide pQE30 und PCR2.1.

### 5.1.6 Antikörper und Antiseren

#### Enzym konjugierte Antiseren

Peroxidase konjugierte Ziege Anti-Kaninchen IgG (Promega, Madison USA)

Peroxidase konjugierte Kaninchen Anti-Ziege IgG (Sigma)

Peroxidase konjugierte Anti-Digoxigenin F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente (Roche)

#### nicht markierte Antiseren

Polyklonales Ziegenserum gegen Plasminogen (HCH)

Polyklonales Kaninchenserum gegen das Eno-Protein nach Immunisierung mit aufgereinigtem, rekombinantem Eno-Protein nach Standardprotokoll von Eurogentech (Belgien) hergestellt.

Polyklonales Kaninchenserum gegen Pneumokokken wurde nach Immunisierung mit hitzeinaktivierten Bakterien der Stämme R6x und ATCC 11733 von Eurogentech (Belgien) hergestellt.

Polyklonales Kaninchenserum gegen die  $\alpha$ -Enolase von *Streptococcus pyogenes* (SEN) wurde zur Verfügung gestellt von V. Fischetti (Fischetti und Pancholi, 1998).

### 5.1.7 Reagenzien

Eine Auflistung verwendeter Chemikalien und Verbrauchsmittel ist dem Anhang zugefügt.

#### 5.1.7.1 Enzyme und Nukleinsäuren für Versuche mit DNA

DNA-Größenstandards:

1 kb-ladder	Gibco
100 bp-plus	MBI
$\lambda$ -HindIII	Gibco

DIG-Marker ( $\lambda$ -HindIII, DIG-markiert)	Roche
AGSGold DNA Polymerase (5 U ml <sup>-1</sup> )	Hybaid
10 x PCR-Puffer	
10 x Enhancer solution	
dNTP-Mix (40 mM)	

BioThermStar™ Taq-Polymerase (5000 U ml <sup>-1</sup> )	Genecraft
10 x Puffer	
dNTP-Mix (10 mM)	

DIG-markierte dNTPs	Roche
---------------------	-------

T4-DNA-Ligase (400000 U ml <sup>-1</sup> )	Roche
10 x Puffer für T4-DNA-Ligase	

Expand™ -DNA-Polymerase (3500 U ml <sup>-1</sup> )	Roche
10 x PCR-Puffer	Roche

M-MLV Reverse Transkriptase (200000 U ml <sup>-1</sup> )	Gibco
5 x Puffer	
DTT (100 mM)	
dNTP-Mix (10 mM)	

Oligo-dT-Primer (0,5 mg ml <sup>-1</sup> )	Life Technologies
--	-------------------

RNAsin (40000 U ml <sup>-1</sup> )	Promega
------------------------------------	---------

Terminator Ready Reaction Mix:

5 x PCR-Puffer
Dye-Deoxynukleotide (Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin)
Ampli taq-Polymerase
dNTP-Mix

### 5.1.7.2 Restriktionsendonukleasen

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs bezogen

Restriktionsenzym	Unitangabe	Erkennungssequenz
<b>BamHI</b>	(20000 U ml <sup>-1</sup> )	G↓GATCC
<b>BglII</b>	(10000 U ml <sup>-1</sup> )	A↓GATCT
<b>EcoRI</b>	(10000 U ml <sup>-1</sup> )	G↓AATTC
<b>HindIII</b>	(20000 U ml <sup>-1</sup> )	A↓AGCTT
<b>NotI</b>	(10000 U ml <sup>-1</sup> )	GC↓GGCCGC
<b>Sau3A</b>	( 4000 U ml <sup>-1</sup> )	↓GATC
<b>SmaI</b>	(20000 U ml <sup>-1</sup> )	CCC↓GGG
<b>XhoI</b>	(20000 U ml <sup>-1</sup> )	C↓TCGAG

**Tabelle 12:** Restriktionsenzyme

### 5.1.7.3 Enzyme für Versuche mit Proteinen

Carboxypeptidase B	[EC: 3.4.17.2; 17 U mg <sup>-1</sup> ]	Sigma
Carboxypeptidase Y	[EC: 3.4.16.1; 100 U mg <sup>-1</sup> ]	Sigma
Lactatdehydrogenase	[EC: 1.1.1.27; 8380 U mg <sup>-1</sup> ]	Sigma
Enolase (aus Hefe)	[EC: 4.2.1.11; 81 U mg <sup>-1</sup> ]	Sigma
Hyaluronidase	[EC: 3.2.1.35; 6250 U ml <sup>-1</sup> ]	Applichem
Lysozym	[EC: 3.2.1.17; 48800 U mg <sup>-1</sup> ]	Sigma
Neuraminidase	[EC: 3.2.1.18; 3 U mg <sup>-1</sup> ]	Sigma
Pepsin	[EC: 3.4.23.1; 3900 U mg <sup>-1</sup> ]	Sigma
Pronase E	[EC: 3.4.24.4; 4000 U mg <sup>-1</sup> ]	Merck
Pyruvatkinase	[EC: 2.7.1.40; 540 U mg <sup>-1</sup> ]	Sigma
Trypsin	[EC: 3.4.21.4; 40 U mg <sup>-1</sup> ]	Merck
Urokinase	[EC: 3.4.21.73; 0,42 U mg <sup>-1</sup> ]	Sigma

### 5.1.7.4 Antibiotika

Ampicillin	Sigma
Erythromycin	Sigma
Kanamycin	Serva
Tetracyclin	Serva

### 5.1.7.5 Molekularbiologische Kits

Abi Sequenzierung Prism™ Ready Reaction Kit	Applied Biosystems
Dig Oligonucleotide 3'-End Labeling and Detection Kit	Roche
QIAGEN Purifikation Kits	Qiagen

QIAGEN genomic DNA Kit  
QIAGEN Plasmid Midi Kit  
QIAprep Spin Plasmid Kit  
QIAquick Gel Extraction Kit  
QIAquick Nukleotide Removal Kit  
QIAquick PCR-Purifikation Kit  
RNeasy®Midi Kit

#### 5.1.7.6 Puffer und Lösungen, soweit nicht in Methoden beschrieben

##### **CHAPS-Inkubationspuffer:**

150 mM KCl, 10 mM EDTA, 20 % Glycerin, 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.2

##### **DNA-Probenpuffer (10 x Puffer):**

50% Glycerol in TAE-Puffer, 100 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7.8

**Filmentwicklung:** Entwickler-Lösung (Ilford Multigrade Paperdeveloper)  
Stop-Lösung (Ilford IN-1 self-indicating Stop bath)  
Fixierer-Lösung (Ilford Paper Fixer)

**High-SDS-Puffer:** 7 % SDS, 50 % deionisiertes Formamid, 5 x SSC, 50 mM NaPO<sub>3</sub>, pH 7.0, 0,1 % N-Laurylsarcosin, 2,0 % Blockreagenz (Roche)

##### **KGB-Puffer (10 x Puffer) für Restriktionsendonukleasen:**

1 M Kaliumglutamat, 0,25 M Tris-Acetat, pH 7.6, 0,1 M Magnesiumacetat, 5 % BSA (10 mg ml<sup>-1</sup>), 0,04 % 2-Mercaptoethanol (5 mM), sterilfiltriert

**10 x MOPS-Puffer:** 200 mM MOPS, 50 mM NaOAc, 10 mM EDTA, pH 7.0

**PBS:** 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7.4

**PBST:** PBS mit 0,05 % Tween 20

##### **Pre-Mix für Sequenzreaktion:**

5 x Polymerasepuffer, Dye-ddNTPs, 4 U Ampli-Taq-Polymerase, dNTPs

##### **Protein-Probenpuffer:**

0,5 M Tris-Base, 10 % Glycerol, 2,5 % SDS, 0,05 % Bromphenolblau, 5% β-Mercaptoethanol, pH 6.8

##### **Proteintransferpuffer:**

25 mM Tris-Base, 1,92 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,037 % SDS

**Puffer A:** 8 M Harnstoff, 1 % SDS, 0,5%  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7.0

**Puffer B:** 10 % Essigsäure, 50 % Ethanol, 40 % ddH<sub>2</sub>O

**5 x RNA-Probenpuffer:**

0,15 % Bromphenolblau, 4 mM EDTA, 0,1 mg Ethidiumbromid, 1 M Formaldehyd, 20 % Glycerin, 30 % Formamid, 2,5 x MOPS-Puffer

**2 x SSC** 0,3 M NaCl, 30 mM Na-Citrat, pH 7.0

**TAE:** 40 mM Tris-Acetat, 1mM EDTA, pH 8.0

**TBS:** 50 mM Tris-Base, 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, pH 7.0

**TE:** 10 mM Tris Base, 1mM EDTA, pH 8.0

### 5.1.8 Computerunterstützte Datenanalyse

DNA-Sequenzanalysen und Alignments wurden mit den Programmen EditSeq, MegAlign, MapDraw und SeqMan des DNASTAR Pakets (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin, USA) von Lasergene vorgenommen. Zur Analyse von Sequenzhomologien und funktionellen Genbereichen wurden die Programme FASTA und BLAST verwendet. Datenbankvergleiche wurden am „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) unter [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) durchgeführt. Analysen auf Proteinebene erfolgten mit Hilfe des „Expert Protein Analysis System Molecular Biology Server“ ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)). Die Daten aus der Sequenzierung eines Typ 4 *Streptococcus pneumoniae*-Stammes wurden vom Institute for Genomic Research (TIGR) über [ftp://ftp.tigr/pub/datas/s\\_pneumoniae](ftp://ftp.tigr/pub/datas/s_pneumoniae) bezogen. Die Texte und Abbildungen dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Software-Pakets Microsoft Office 2000, die Grafiken mit dem Programm Excel 2000 und die Darstellungen mit Corel Draw 10.0 erstellt.

## 5.2 Methoden auf DNA-Ebene

### 5.2.1 Agarosegelelektrophorese (Sambrook et al., 1989)

Zur qualitativen und quantitativen DNA-Analyse wurde Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Je nach Größe der zu untersuchenden DNA wurden 0,8-2,0 % Agarosegelele eingesetzt und TAE als Elektrodenpuffer. Die DNA wurde vor dem Auftrag mit 1/6 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und zusammen mit einem Längenstandard auf das Gel geladen. Die Elektrophorese wurde bei 80-120 Volt durchgeführt. Zur Analyse der aufgetrennten DNA wurde das Agarosegel nach der Elektrophorese für 10 min in 3  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Ethidiumbromid-Lösung gelegt. Die DNA wurde anschließend unter UV-Licht (254 nm) mit einem Videoauswertungssystem (Herolab) sichtbar gemacht.

### 5.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte im Photometer (4054 UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec Plus) bei 260 nm in 1 ml Quarzküvetten. Es wurden 10 µl der DNA in 1 ml H<sub>2</sub>O vermessen. Eine OD von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA 50 µg ml<sup>-1</sup>, bei einzelsträngiger DNA und RNA 40 µg ml<sup>-1</sup>. Zur Qualitätskontrolle wurden ebenfalls Messungen bei 280 nm und 230 nm durchgeführt. Der Quotient der Meßergebnisse bei 260 nm/230 nm gibt Aufschluß über Phenolverunreinigungen in der Probe, während der Quotient der Meßergebnisse bei 260 nm/280 nm Aussagen über den Gehalt an Proteinen, die einen Anteil an aromatischen Aminosäuren enthalten, zulässt.

### 5.2.3 Phenol/Chloroform-Extraktion

Diese Aufreinigungsmethode wurde eingesetzt, um Plasmid-DNA oder DNA-Fragmente nach enzymatischen Reaktionen aufzureinigen, Pufferwechsel vorzunehmen oder Proteine und Nukleotide zu trennen. Die DNA-Lösung wurde im Verhältnis 1:1 mit Phenol gemischt und 5 min bei 20800 x g zentrifugiert. Die DNA-haltige, wässrige Phase wurde abgenommen und zur Abtrennung von Phenolresten mit einem Volumen Phenol/Chloroform (50% Phenol, 50% Chloroform) extrahiert. Dieser Schritt wurde 2 bis 3 mal wiederholt. Zur Entfernung von Chloroformresten wurde die DNA gefällt. Zur Aufreinigung von Ligationsansätzen wurde kein Phenol/Chloroform verwendet. Die Entfernung von Phenolresten aus der wässrigen Phase erfolgte mittels Diethylether.

### 5.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR, Saiki et al., 1988)

Mit Hilfe der PCR konnten definierte DNA-Abschnitte mit spezifischen Oligonukleotiden (Primer) amplifiziert werden. An der Amplifikation waren zwei Oligonukleotide gegensätzlicher Orientierung beteiligt, die mit dem 3'-Ende jeweils eines der beiden DNA-Einzelstränge des zu amplifizierenden DNA-Fragments hybridisierten. Die in vitro-Vervielfältigung der spezifischen DNA-Abschnitte wurde im PCR-Thermocycler (Hybaid) durchgeführt und beinhaltete die Denaturierung der DNA, das Annealing der Primer und die Polymerase-Reaktion (Elongation) in 30-35 Zyklen. Jeder PCR-Ansatz wurde in 50 µl Volumen durchgeführt und enthielt als Template-DNA zwischen 50 ng und 100 ng DNA. Der Reaktionsansatz enthielt weiterhin 10 x Reaktionspuffer mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 nM Primer DNA, 200 µM dNTP-Mix, 0,2 U AGSGold™ DNA-Polymerase.

Die Denaturierung erfolgte zunächst in einem Zyklus bei 94°C für 4 min und in den repetitiven Zyklen für 60 sek. Das Annealing der Primer wurde für 30 sek bei einer Temperatur durchgeführt, die 5-8°C unter der errechneten Schmelztemperatur der Primer lag. Die Dauer der Elongation wurde in Abhängigkeit der Amplifikatlänge gewählt (1 min Elongationszeit für 1 kb DNA-Fragmentgröße) und erfolgte bei 72°C. Zur Amplifizierung wurden 30 Zyklen durchlaufen. Zum Abschluß ermöglichte eine 4 min Elongationsphase die Vervollständigung angefangener Amplifikate. Bei Durchführung des „Hot-Start“ wurde die Polymerase erst nach der 2 minütigen Denaturierung zum Reaktionsansatz gegeben. Dieser „Hot-Start“ diente dazu, unspezifisches Annealing und damit falsche PCR-Produkte zu verhindern und das



Enzym vor Aktivitätsverlust während des ersten längeren Denaturierungsschrittes zu schützen. Nach Abschluß der PCR wurde die vollständige und spezifische Amplifikation Produkte in einem 0,8 % Agarosegel mit dem 1kb-Ladder als DNA-Größenstandard überprüft. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte durch den QIAquick® PCR Purification Kit (siehe 5.2.8).

## 5.2.5 DNA-Präparation

### 5.2.5.1 Präparation genomischer DNA von *Streptococcus pneumoniae*

Die Präparation genomischer DNA von Pneumokokken erfolgt mit Hilfe der Qiagen genomic Midi tip 100/G und den entsprechenden Pufferlösungen nach einem modifizierten Protokoll.

Pneumokokken-Stämme wurden in 30 ml THY-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bei 37°C kultiviert und anschließend bei 8500 x g für 15 min sedimentiert. Das Bakteriensediment wurde in 3,5 ml Puffer B1 mit 0,25 mg RNase resuspendiert und zur Bakterienlyse mit 1,25 mg Lysozym, 2,5 mg Pronase E und 250 U Mutanolysin für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 1,2 ml Puffer B2 zur Proteindenaturierung dazugegeben und die Suspension mind. 30 min bei 50°C inkubiert. Die Präparation der genomischen DNA erfolgt durch QIAGEN-Säulen für genomische DNA (Midi tip 100/G) nach den Protokollvorlagen des Herstellers. Die gefällte und gereinigte DNA wurde in 200 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Zur Qualitätskontrolle wurde die DNA auf ein 0,8 % Agarosegel geladen und zur Konzentrationsbestimmung im Photometer vermessen.

### 5.5.1.2 Präparative Plasmidisolierung aus *E. coli*

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde der Plasmid-Isolierungskit von Qiagen (QIAgen®Midi Kit) nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll durchgeführt. Die Plasmidisolierung erfolgte hierbei aus einer über Nacht bei 37°C schüttelnd kultivierten 100 ml *E. coli*-Suspension in LB-Medium mit Antibiotikazusätzen. Die Plasmid-DNA wurde dabei nach einer alkalischen Lyse der Bakterien über eine Ionenaustauschersäule aufgereinigt. Die Präzipitation der DNA erfolgte mit 3,5 Volumen Isopropanol. Nach Zentrifugation des Eluats bei 4°C für 30 min und 19000 x g wurde das Präzipitat mit 1 ml Ethanol 70% gewaschen. Anschließend wurde die DNA getrocknet und in 200 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt wie unter 5.2.2 beschrieben.

### 5.5.1.3 Plasmid-Schnellpräparation aus *E. coli* (Birnboim und Doly, 1979)

Zur Plasmidpräparation im kleinen Maßstab wurde die Bakterienkultur über Nacht bei 37°C in je 4 ml LB-Medium mit Antibiotikazusätzen schüttelnd kultiviert. 1,5 ml der Bakteriensuspension wurden für 5 min bei 8000 x g sedimentiert. Die Bakterien wurden anschließend in 200 µl Lösung 1 (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA) mit 10 µl Lysozymlösung (20 mg ml<sup>-1</sup>) resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl frisch angesetzter Lösung 2 (100 µl 10 N NaOH, 500 µl 10 % SDS, 4,4 ml ddH<sub>2</sub>O) wurde jeder Ansatz zur alkalischen Lyse sofort invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte durch Zugabe von

300 µl Lösung 3 (7,5 M Ammoniumacetat, pH 7.4) die Ammoniumsulfatfällung von Proteinen für weitere 10 min auf Eis. Zur Abtrennung von Proteinen, Membranresten und genomischer DNA folgte die Zentrifugation des Bakterienlysats bei 19000 x g für 10 min bei RT. 750 µl des klaren Überstandes wurden zur Plasmidpräzipitation mit einem Volumen Isopropanol versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Fällung bei 19000 x g für 10 min sedimentiert und anschließend mit eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen. Die DNA wurde nochmals bei 19000 x g für 10 min zentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde dann in 50 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, zum Abbau vorhandener RNA mit 0,82 KU RNase versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Konzentrationsabschätzung erfolgte anschließend eine Agarosegelelektrophorese (siehe 5.2.1).

### **5.2.6 Präzipitation von DNA**

Die Fällung der DNA erfolgte nach Erhöhung der Salzkonzentration durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,4) und 2,5 Volumen absolutem Ethanol für mindestens 30 min bei -20°C. Das Präzipitat wurde anschließend 5 min bei 4°C und 19000 x g sedimentiert und mit kaltem 70 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des DNA-Sediments bei 37°C erfolgte die Resuspension in 10 µl ddH<sub>2</sub>O. Die Nukleinsäure wurde bei -20°C gelagert.

### **5.2.7 DNA-Extraktion aus einem präparativen Agarosegel**

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem präparativen Agarosegel erfolgte mit dem DNA-Gelextraction Kit von Qiagen nach den Protokollangaben des Herstellers. Nach der Auftrennung der DNA in einem präparativen Agarosegel bei 70 Volt wurde die DNA nach Interkalation von Ethidiumbromid sichtbar gemacht und die Gelbereiche mit den gewünschten Fragmenten aus dem Agarosegel geschnitten. Entsprechend dem Gewicht des Gelstückes wurde zum Schmelzen der Agarose 3 Massevolumen Schmelzlösung zugegeben und bis zur vollständigen Auflösung des Gels bei 50°C leicht schüttelnd inkubiert. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe von Ionenaustauschersäulen von Qiagen®. Zur Elution der DNA von der Säule wurden zwischen 10 und 20 µl ddH<sub>2</sub>O verwendet. Anschließend erfolgte die Kontrolle der Konzentration im Agarosegel (5.2.1).

### **5.2.8 Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem QIAquick® PCR Purification Kit**

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurden 5 Volumen des Puffers PB in 2 ml Gefäße vorgelegt und mit dem PCR-Produkt versetzt. Anschließend wurde die Lösung auf eine Ionentauscher-Säule geladen und 1 min bei 17900 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 750 µl Waschpuffer gewaschen. Durch wiederholtes Zentrifugieren für jeweils 1 min bei 17900 x g wurde der gesamte Waschpuffer aus der Säule entfernt und die DNA mit 50 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert.

## 5.2.9 Methoden zur DNA-Klonierung

### 5.2.9.1 Enzymatische Restriktion von Nukleinsäuren

Zur enzymatischen Spaltung von DNA wurde jeweils 1U Enzym für die Restriktion von 1 µg DNA unter Zugabe von KGB-Puffer in einfacher Endkonzentration eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in der Regel für 1,5 Stunden bei 37°C im Thermoblock. Anschließend erfolgte eine Kontrolle der Restriktion im Agarosegel. Die Spaltung von jeweils 5 µg genomischer DNA zur Southernblot-Analyse wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank durchgeführt.

### 5.2.9.2 Dephosphorylierung von Nukleinsäuren

Die Dephosphorylierung linearisierter DNA erfolgte mit alkalischer Phosphatase (AP) aus dem Kälberdarm (CIP), die eine Hydrolyse der 5'Phosphatenden von DNA, RNA und Nukleotiden katalysiert und somit einer Verknüpfung zur Phosphodiesterbindung der Vektorenden entgegenwirkt. Der linearisierte Vektor wurde mit 1U AP im vom Hersteller empfohlenen Dephosphorylierungspuffer 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch 15 min Erhitzen auf 75°C.

### 5.2.9.3 Ligation von Nukleinsäuren

Bei der Ligation kommt es zu einer enzymatischen, ATP-abhängigen Phosphodiester-Bindung zwischen der freien 3'Hydroxylgruppe und der freien 5'Phosphatgruppe zweier Doppelstrang-Nukleinsäuren. Die Ligation wurde bei 14°C über Nacht in 1 x Ligasepuffer in einem Reaktionsvolumen von 10 µl mit 400 U T4-DNA Ligase (400000 U ml<sup>-1</sup> von NEB) durchgeführt, wobei die Konzentrationen von Vektor und DNA-Fragment jeweils 100 ng betrugen. Bei "blunt-end" Ligationen wurden Vektor und DNA-Fragment im Mengenverhältnis 1:3 kloniert. Nach Aufreinigung der Ligationen über Phenol/Diethylether-Methode (5.2.3) und Aufnahme in 10 µl ddH<sub>2</sub>O erfolgte die Transformation der ligierten Plasmide in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Bakterien.

## 5.2.10 Methoden zur Transformation von Bakterien

### 5.2.10.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien (Böttger, 1988)

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli* erfolgte eine Flüssigkultur der Bakterien in LB-Medium bei 37°C und 120 rpm schüttelnd bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bis 1. Die Bakterien wurden zentrifugiert und das Sediment zweimal mit 4°C kaltem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 4°C kalter steriler 10 % Glycerinlösung. Das Zellsediment wurde dann in 3 ml 4°C kalter 10 % Glycerinlösung resuspendiert, zügig zu 40 µl Aliquots in Reaktionsgefäße gefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### 5.2.10.2 Elektroporation (Calvin und Hanawalt, 1988)

Die Elektroporation ist neben der  $\text{CaCl}_2$ -Transformation eine effiziente Möglichkeit um Fremd-DNA in elektrokompente *E.coli*-Bakterien einzubringen. Zur Elektroporation wurden 40  $\mu\text{l}$  der elektrokompenten Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 100 – 200 ng Plasmid-DNA vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die physikalischen Parameter für die Elektroporation waren 25  $\mu\text{F}$ , 400  $\Omega$  und 2,5 kV. Sofort nach der Elektroporation wurden die Bakterienzellen in 1 ml auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium überführt und eine Stunde bei 37°C und 120 rpm schüttelnd inkubiert. Zur Selektion auf Fremd-DNA enthaltenen Bakterien wurde der Transformationsansatz auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 5.2.10.3 Transformation von *Streptococcus pneumoniae* (Yother et al., 1986)

Pneumokokken weisen eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von Fremd-DNA auf (Avery et al., 1931), die durch Zugabe des Kompetenz-stimulierenden Peptides (CSP) gesteigert werden kann. Ausgehend von einer frischen Blutagarkultur wurden die Pneumokokken in 5 ml CpH8-Medium bis zum Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,15 bei 37°C ruhend kultiviert. Nach Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  CSP  $1\text{mg ml}^{-1}$  wurden die Bakterien für weitere 20 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend folgte ein kurzer Kältschock für 4 min auf Eis. 250  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension wurde mit 1  $\mu\text{g}$  Fremd-DNA für 30 min bei 30°C ruhend inkubiert. Anschließend wurde nicht aufgenommene DNA durch Zugabe von 2,3 U DNase abgebaut und die Suspension zur Regeneration der transformierten Pneumokokken für weitere 60 min bei 37°C ruhend inkubiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf antibiotikahaltigen Blutagarplatten ausplattiert, die zuvor mit 5 ml THY-Top-Agar überschichtet worden waren. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C kultiviert. Transformanden wurden am folgenden Tag auf frische Blutagarplatten mit erhöhter Antibiotikakonzentration zur weiteren Selektion überimpft. Die Kontrolle der Transformation erfolgte durch Restriktionsanalyse der genomischen DNA (5.2.9.1) bzw. durch in einem Southern-Blot (5.2.13.1/2).

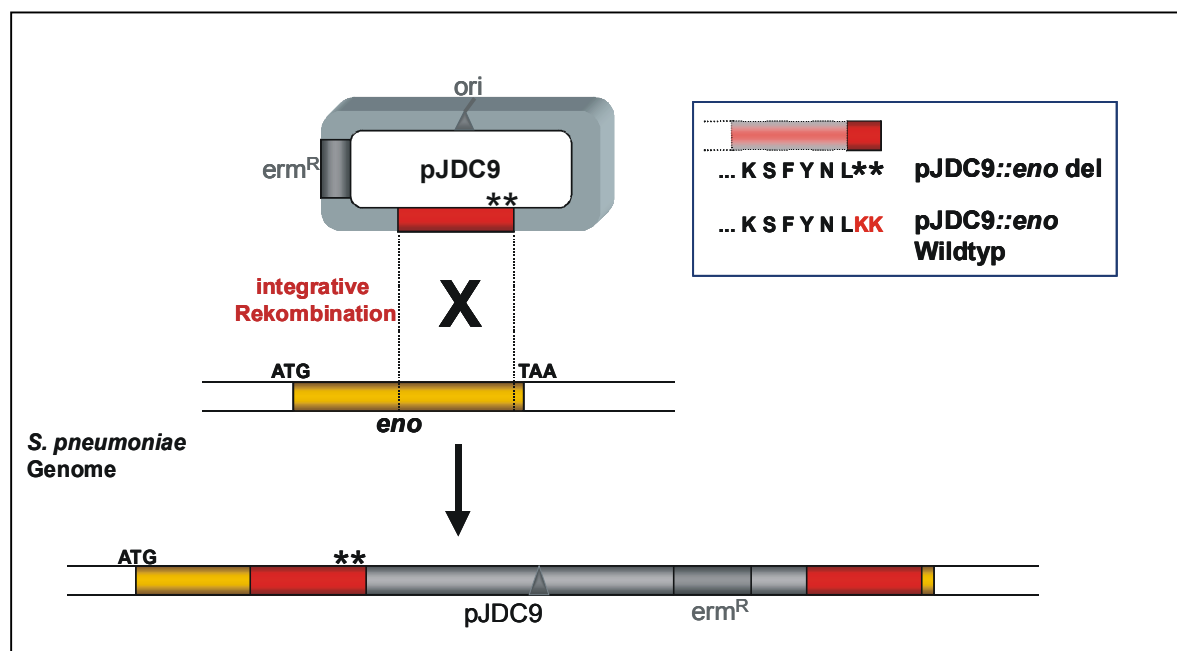
### 5.2.10.4 DNA-Sequenzierung (Sanger et al., 1977)

Zur Überprüfung der DNA-Sequenzen von PCR-Amplifikaten wurden die DNA-Fragmente sequenziert. Diese nicht-radioaktive Sequenziermethode beruht auf dem von Sanger beschriebenen Kettenabbruchverfahren. Die automatisierte DNA-Sequenzierung erfolgte nach einer PCR-Reaktion, bei der fluoreszenzmarkierte Terminatorkleotide (Dye-Deoxy-Nukleotide) verwendet wurden. Die vier Didesoxynukleotide tragen verschiedene Fluorophore mit unterschiedlichen spektroskopischen Eigenschaften. Für die Sequenzreaktion wurden 500 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Der PCR-Ansatz enthielt 10 pmol des Oligonukleotides und 4  $\mu\text{l}$  Pre-Mix in einem Reaktionsvolumen von 20  $\mu\text{l}$  in  $\text{ddH}_2\text{O}$ . Die PCR-Sequenzreaktion bestand aus 25 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt bei 96°C für 15 sek., einer Annealingphase von 15 sek. bei der für den Primer optimalen Annealingtemperatur und 4 min Elongation bei 60°C. Nach der PCR-Reaktion erfolgte die Aufreinigung der DNA über Dye-Ex-Säulen (DyeEx™Spin Kit) nach den Angaben des Herstellers.

Anschließend wurde der Sequenzierungsansatz in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Vor einer Auftrennung im Polyacrylamidgel wurde die DNA in 3 µl Probenpuffer (Formamid : Ethanol = 1:5) resuspendiert. Nach der Laser-Detektion der fluoreszierenden Banden mit Hilfe eines Kapillarsquenzers wurden die Elektrogramme und die daraus hervorgehenden DNA-Sequenzen in den Computer eingegeben. Unter Nutzung des Sequenzierungsprogrammes SeqMan (DNA-Star, Lasergene) wurden die Sequenzen überprüft und bearbeitet.

### 5.2.11 Insertions-Duplikations-Mutagenese

Zur Herstellung von Pneumokokkenmutanten, wurde der pJDC9-Vektor verwendet (Morrison *et al.*, 1984). Aufgrund eines fehlenden Replikationsursprunges für Gram positive Bakterien, erfolgt keine autonome Replikation dieses Vektors in Streptokokken. Damit ist dieses Plasmid in *S. pneumoniae* nicht stabil. Zur Herstellung von Pneumokokkenmutanten, die modifizierte Eno-Proteine exprimieren, wurde das *eno*-Gen mit entsprechenden Punktmutationen als DNA-Fragment in den Vektor pJDC9 kloniert. Die Erythromycinresistenz des Vektors ermöglichte die Selektion auf Insertions-Duplikations-Mutanten. Nach Präparation des pJDC9-Derivats wurden 1 µg zur Transformation der *Streptococcus pneumoniae*-Stämme R6x und ATCC 11733 nach beschriebenem Protokoll eingesetzt. Die komplementären Bereiche des genomischen *eno*-Gens rekombinieren homolog mit dem entsprechenden Bereich des Vektorinserts und es kommt zur Integration des gesamten Vektors in das Genom. Der genomische Bereich, der als Insert gewählt wurde, liegt dann dupliziert vor, wobei die beiden Kopien partiell aus der ursprünglichen genomischen Kopie des Gens und partiell aus der des Inserts stammen. Daher wird diese Mutagenese auch als Insertions-Duplikations-Mutagenese bezeichnet. Die Überprüfung der korrekten Lokalisation der pJDC9-Derivate im Genom erfolgte durch PCR-Analyse. Hierzu wurden die Fragmentgrößen der *eno*-Genabschnitte nach der Transformation mit Oligonukleotiden bestimmt, die am Genstart bzw. am Genstop binden.



**Abbildung 43:**

Schematische Darstellung der Insertions-Duplikations-Mutagenese von *Streptococcus pneumoniae* mit pJDC9-Derivaten.

### 5.2.12 "Site-directed Mutagenesis" (Ho *et al.*, 1989)

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methode beruht auf der Einführung einer Punktmutation in ein Gen durch PCR-Amplifikation und wurde mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene nach den Protokollvorgaben des Herstellers durchgeführt. Ausgehend von der Sequenz des DNA-Bereiches in dem Punktmutationen eingeführt werden sollten, wurden Oligonukleotide synthetisiert, die bis zu drei Tripletttaustausche enthielten. Die Primer verfügten jeweils über mindestens 20 bp an beiden Seiten der Punktmutation und waren über Polyacrylamidgelelektrophorese aufgereinigt. Als PCR-Template diente das aufgereinigte Plasmid mit dem DNA-Abschnitt des zu mutierenden Gens. Ausgehend von dem Bereich der Punktmutation führte die Elongation der Primer durch die Pfu-Turbo-Polymerase zu einer inversen Amplifikation des gesamten Plasmides. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit der Endonuklease *DpnI* für 1 h bei 37°C inkubiert. *DpnI* spaltet spezifisch methylierte DNA und zerstört so das Templateplasmid. Das nicht methylierte, punktmutierte PCR-Amplifikat wurde durch Hitzeschock in kompetente XL1-Blue-Bakterien transformiert und zur Selektion auf antibiotikahaltige LB-Platten bei 37°C über Nacht kultiviert. Die Überprüfung der Mutagenese erfolgt durch DNA-Sequenzierung (5.2.10.4) und Restriktionsanalyse (5.2.9.1). Zur Expression des Proteins, für das die modifizierte DNA kodiert, wird das Plasmid in M15-Bakterien transformiert. Die Proteinexpression erfolgt wie unter 5.3.9 beschrieben.

### 5.2.13 Methoden zum spezifischen DNA-Nachweis

#### 5.2.13.1 Southern Blot (Southern, 1975)

Beim Southern-Blot handelt es sich um ein Verfahren, dass für die Übertragung einzelsträngiger DNA und denaturierter doppelsträngiger DNA von einem Agarosegel auf eine Nylonmembran oder einen Nitrocellulosefilter entwickelt wurde. Zunächst wurde die durch Restriktionsendonukleasen geschnittene genomische DNA elektrophoretisch auf einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt, kurz mit Ethidiumbromid angefärbt und fotografiert. Die im Gel fixierte DNA wurde durch 15 minütige Inkubation mit 0,25 M HCl depuriniert und anschließend durch Schwenken in 0,4 N NaOH für 15 min denaturiert. Der DNA-Transfer auf eine Nylon Membran (Immobilon) erfolgte für 2,5 h durch einen alkalischen Graviditäts-unterstützten Blotaufbau mit 0,4 N NaOH als Transferpuffer. Die Membran wurde anschließend zweimal für 10 min mit 2 x SSC gewaschen und bei RT getrocknet. Danach wurde die DNA mit 120 mJoule im UV-Stratalinker (UV Stratalinker 1800 Stratagene) mit der Membran quervernetzt (Li *et al.*, 1987) und für 20 min bei 120 °C im Trockenschrank gebacken.

#### 5.2.13.2 Kolonie-Hybridisierung (Grunstein und Hogness, 1975)

Mit Hilfe der Kolonie-Hybridisierung wurden nach Transformation spezifisch rekombinante Klone detektiert und isoliert. Nach der Kultur auf LB-Platten wurden die Bakterien auf Nylonmembranen transferiert (Bio-Rad) und durch Auflegen der Membran auf in 10% SDS getränkte Whatmanfilter (3MM Whatman International

Ltd., Maidstone, Großbritannien) für 3 min bei RT alkalisch lysiert. Anschließend wurde die DNA für 5 min mit 0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl denaturiert und mit 1,5 M NaCl / 0,5 M Tris (pH 8.0) für weitere 5 min neutralisiert. Nach dem Waschen der Membran für 5 min mit 2 x SSC wurde sie bei RT getrocknet. Die DNA-Fixierung erfolgte analog zu Durchführung nach Abschluss eines Southern-Transfers (siehe 5.2.13.1).

### 5.2.13.3 Digoxigenin (DIG)-Markierung von Oligonukleotiden mittels PCR

Die Markierung von Oligonukleotiden mit Digoxigenin wurde mit dem DNA Labelling and Detection Kit von Roche durchgeführt und diente zur Herstellung von nicht-radioaktiven DNA-Sonden, die zur Identifizierung von homologen Sequenzen in der DNA-DNA-Hybridisierung genutzt wurden. Die Markierung der linearisierten und denaturierten DNA erfolgte durch den Einbau von Digoxigenin-dUTP im Verlauf einer PCR. Die Detektion der DIG-markierten DNA-Fragmentsonde erfolgt über einen an alkalischer Phosphatase gekoppelten polyklonalen Schaf-anti-DIG-Antikörper (bzw. Fab-Fragmente). Bei Zugabe des Substrats CSPD erfolgt eine enzymatische Dephosphorylierung, die eine Umlagerung der konjugierten Doppelbindungen im zyklischen Ringsystem des Substrats zur Folge haben. Die resultierende Lichtemission bewirkt eine punktuelle Belichtung von Röntgenfilmen, auf denen dann positive Signale zu erkennen sind.

### 5.2.13.4 DNA-DNA-Hybridisierung

Die Hybridisierung mit einer spezifischen DNA-Sonde ermöglicht die Detektion von homologen Genabschnitten innerhalb eines Genoms. Die Hybridisierungssonde kann entweder radioaktiv oder mit Digoxigenin markierten dNTP's markiert werden. In dieser Arbeit wurde die PCR-vermittelte Digoxigeninmarkierung angewandt (siehe 5.2.13.3).

Die Membran wurde zunächst 2 h in High-SDS-Puffer bei 42°C äquilibriert. Die Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten und denaturierten Sonde erfolgte über Nacht bei 42°C in High-SDS-Puffer mit Heringssperm DNA. Die Heringssperm-DNA diente hierbei zur Absättigung unspezifischer DNA-Bindungsstellen auf der Membran. Die Membran wurde nach der Hybridisierung zweimal für 10 min bei 30°C mit 2 x SSC mit 0,1% SDS und zweimal für 30 min bei 60°C mit 0,1 x SSC und 0,1% SDS unter stringenten Bedingungen gewaschen. Im Anschluss daran wurde die Membran für 1-5 min in Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 0,3% TWEEN® 20, pH 7.5) geschwenkt und es folgte eine 30 minütige Inkubation in Absättigungspuffer (1% Blockierungsreagenz von Roche in 0,1 M Maleinsäure). Der Nachweis spezifisch gebundener DNA erfolgte durch einen Immunoassay mit Anti-Digoxigenin Antikörpern, an die Alkalische Phosphatase konjugiert war und mit CSPD als Substrat nach den Protokollvorgaben des Herstellers. Die Detektion der Hybridisierungssignale erfolgte nach Röntgenfilmmexposition für 1-24 h und Entwicklung der Röntgenfilme. Da die Membran mehrmals hybridisiert werden sollte, wurde nach der Filmentwicklung die gebundene Sonden-DNA durch Schwenken der Membran zweimal für 15 min in 0,4 M NaOH mit 0,1% SDS bei 45°C von der Membranoberfläche entfernt. Anschließend wurde die Membran 10 min mit 200 mM Tris-HCl, 0,1 x SSC, 0,1 % SDS, pH 7.0 gewaschen und bis zur folgenden Hybridisierung in 2 x SSC-Puffer aufbewahrt.

## 5.2.14 Methoden für das Arbeiten mit RNA

### 5.2.14.1 RNA-Präparation aus Bakterien

Die Präparation von bakterieller RNA aus *Streptococcus pneumoniae* erfolgte ausgehend von einer 20 ml Pneumokokkenkultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,4 in THY-Medium mit dem Rneasy® Midi Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

### 5.2.14.2 Elektrophoretische Auftrennung von RNA

Um ein RNA-Transkript spezifisch nachweisen zu können, wurde die RNA nach der Präparation im denaturierenden Gel aufgetrennt und zur Hybridisierung auf eine Nylonmembran transferiert. Zum Schutz der RNA vor Abbau durch RNasen wurden alle verwendeten Lösungen mit DEPC-behandeltem ddH<sub>2</sub>O angesetzt. Um RNA nach ihrer Größe im Elektrophoresegel auftrennen zu können, wird die Ausbildung von Sekundärstrukturen durch die Verwendung von Formaldehyd im Agarosegel verhindert. Formaldehyd bindet kovalent mit den Aminogruppen von Adenin, Cytosin und Guanin und unterbindet so die Ausbildung von Basenpaarungen. Durch Zusatz von Formamid zu den RNA-Proben werden Wasserstoffbrückenbindungen verhindert und die Formaldehydreaktion begünstigt. Der pH-Wert der verwendeten Formaldehydlösung wird über 4.0 gehalten, da bei niedrigeren pH-Werten eine Oxidation des Formaldehyds zu Ameisensäure erfolgt und es damit zu einer Hydrolyse der RNA kommen kann. Zur Herstellung eines 1 %igen Gels wurde 1,0 g Agarose in 87 ml DEPC-ddH<sub>2</sub>O durch Aufkochen vollständig gelöst. Nach Abkühlen auf 60°C wurden 10 ml 10 x MOPS-Puffer und 3 ml Formaldehyd (37 %, Calbiochem, La Jolla, USA) zugegeben, gemischt und das Gel in einen Gelträger gegossen. Zur Vorbereitung der Gelproben wurde 1 bis 5 µg RNA mit 2 µl 10 x MOPS, 3 µl Formaldehyd und 10 µl Formamid in DEPC-ddH<sub>2</sub>O versetzt und für 10 min bei 60°C denaturiert. Nach Zugabe von 5 µl 5 x RNA Probenpuffer zu den RNA-Proben wurde der gesamte Ansatz auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 V für 1,5 h mit MOPS-Laufpuffer (1 x MOPS-Puffer, 250 mM Formaldehyd in DEPC-ddH<sub>2</sub>O). Nach der Entfernung des Formaldehyd durch dreimaliges Waschen für 15 min in DEPC-ddH<sub>2</sub>O, wurde das Gel unter UV-Licht photographiert.

### 5.2.14.3 Transfer der RNA durch Kapillarblot

Nach der Elektrophorese wurde das Gel zweimal in DEPC-ddH<sub>2</sub>O gewaschen und für 15 min in 50 mM NaOH geschwenkt. Anschließend wurde das Gel für 15 min in 20 x SSC neutralisiert. Der Transfer auf eine positiv geladenene Nylonmembran erfolgte über Nacht mittels Kapillarblot mit 20 x SSC als Transferpuffer. Der Blot bestand aus drei Lagen in Transferpuffer getränktem Whatmanpapier (3MM, Whatman International Ltd., Maidstone, Großbritannien), auf die das Gel und die ebenfalls in Transferpuffer äquilibrierte Membran gelegt wurden. Es folgten nochmals zwei Lagen getränktes, zwei Lagen trockenes Whatmanpapier und etwa 10 cm trockenes Filterpapier, das mit einem Gewicht von 500 g beschwert wurde. Nach dem Transfer wurde die Membran zweimal für 10 min in 2 x SSC gewaschen und zur Fixierung der RNA im UV-Stratalinker quervernetzt und für 1h bei 80°C gebacken.



Die Hybridisierung der Membran mit der DIG-markierten Sonde erfolgte nach der unter 5.2.13.4 beschriebenen Methode mit dem DIG Luminescent Detection Kit nach Angaben des Herstellers.

#### **5.2.14.4 Herstellung von cDNA durch reverse Transkription.**

Die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde mit Hilfe des M-MLV Reverse Transkriptase Enzyms von Gibco durchgeführt. Als Template wurden 5 µg einer RNA-Präparation verwendet und zunächst für 10 min mit Oligo-dT-Primern (0,5 µg ml<sup>-1</sup>) und 10 min bei 70°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis für 2 min wurden dNTP-Mix (10 mM), RNasin (40 U ml<sup>-1</sup>), DTT (100 mM) und 5 x Puffer zur Reaktion gegeben und 10 min bei 42°C inkubiert. Durch Zugabe von 200 U Reverse Transkriptase wurde die Reaktion gestartet. Nach 30 min Inkubation bei 42°C wurde die Transkription durch 5 min Inkubation bei 90°C mit 40 µl TE (10/1) beendet.

#### **5.2.14.5 PCR-Amplifikation von cDNA**

Zur Amplifikation von cDNA-Fragmenten wurden jeweils 5 µl der durch Reverse Transkription hergestellten cDNA als Template eingesetzt. Die PCR erfolgte mit der BioThermStar-Polymerase. Hierbei handelt es sich um ein „Hot-Start“-Enzym, das erst nach Inkubation für 7 min bei 95°C sein Aktivitätsoptimum erreicht. Der Amplifikationsansatz enthielt 10 x PCR-Puffer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP-Mix, 0,5 U BiothermStar Taq Polymerase und jeweils 5 pmol der Oligonukleotide in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Das PCR-Programm bestand aus einer Denaturierung bei 94°C für 7 min. Jeder der folgenden 35 Zyklen enthielt eine Denaturierungsphase von 15 sek bei 94°C. Das Annealing der Primer erfolgte für 15 sek. bei einer Temperatur, die 5-8°C unterhalb der errechneten Schmelztemperatur lag. Die Transkriptelongation erfolgte jeweils für 30 sek. bei 72°C. Nach Ablauf der Zyklen beendete eine 5 min. Elongation bei 72°C die PCR-Reaktion. Die Überprüfung der Amplifikation erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

### **5.3 Methoden zum Arbeiten mit Proteinen**

#### **5.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Lämmli *et al.*, 1970)**

Die Wanderung von Proteinen im elektrischen Feld ist abhängig von ihrem Molekulargewicht und von ihrer Nettoladung. Bei der denaturierenden SDS-PAGE erfolgt eine Reduktion der Disulfidbrücken an Sulfhydrylgruppen der Proteine, die dadurch ihre Quartärstruktur verlieren und in Form ihrer Untereinheiten aufgetrennt werden. Durch Zugabe von negativem geladenem Natriumdodecylsulfat (SDS) das sich an hydrophobe Regionen der Proteine anlagert, werden die Gesamtladungen überdeckt und der Ladungseinfluss auf die Elektrophorese neutralisiert.

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingelen erfolgte in 8 % - 16 % Polyacrylamidgelen mit dem vertikalen Elektrophoresesystem MiniProtean (MiniProtean II, Bio-Rad). Als Stammlösung diente eine 35 % Acrylamidlösung mit 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid. Das Trenngel wurde in 1,5 M Tris-HCl, pH 8.8 mit 0,1 % SDS hergestellt. Die Polymerisierung erfolgte durch Zugabe von 0,05 %

Ammoniumpersulfat und 0,1 % TEMED. Zur Proteinauftrennung unter nativen Bedingungen wurde weder  $\beta$ -Mercaptoethanol noch SDS zu den Gelen zugefügt. Das Trenngel wurde mit einem 4 % Polyacrylamid-Sammegel in 0,5 M Tris-HCL, pH 6.8 überschichtet. Die in Proteinprobenpuffer resuspendierten und für 2 min bei 100°C gekochten Proben wurden bei 200 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen wurde bei 80 Volt durchgeführt. Die Molekulargewichte des verwendeten Molekulargewichtsmarkers (MBI Fermentas) sind im Anhang aufgeführt.

### 5.3.2 Färbemethoden

Nach Auftrennen der Proteine im SDS-PAGE wurde das Gel für 2 h in Färbelösung (50 % Methanol, 10 % Eisessig 0,1 % Coomassie Brilliant Blue) gefärbt und anschließend entfärbt (20 % Methanol, 7 % Eisessig). Nach dem Waschen des Gels für 15 min in H<sub>2</sub>O wurde es zwischen zwei Folien eingespannt und 2 h getrocknet (Bio-Rad). Zur Anfärbung von Proteinen auf PVDF-Membranen wurde Ponceau-S verwendet, da es sich hierbei um eine reversible Färbung handelt.

### 5.3.3 Western blot und Blot-overlay (Towbin *et al.*, 1979)

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden im semi-dry Verfahren im Semi Dry Transfer Cell Trans-Blot® SD auf eine zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-(Nylon)-Membran transferiert. Dazu wurden zwei Whatman 3MM Filterpapiere auf die Kathodenplatte der Blotkammer gelegt. Auf die Filterpapiere wurden nacheinander die aktivierte PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel und zwei weitere Whatman Filterpapiere gelegt. Das Polyacrylamidgel wurde vor dem Blot im Proteintransferpuffer äquilibriert und die Filterpapiere darin getränkt. Der Transfer erfolgte für 45 min mit 1 mA pro cm<sup>2</sup> des Gels.

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Antikörperhybridisierung durchgeführt. Dazu wurden die freien Bindungsstellen mit 10 % Magermilch in PBS mindestens 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 20 - 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Protein in PBS für mindestens 1 h bei RT. Nachdem die Membran dreimal mit 10 ml PBS für jeweils 10 min gewaschen wurde, erfolgt die Inkubation mit dem spezifischen Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 in PBS für 1 h bei RT. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit einem Zweitantikörper, der mit einer aus Meerettich isolierten Peroxidase (HRP- horse raddish peroxidase) konjugiert war. Die Entwicklung der Signale erfolgte durch einer Farbreaktion nach Zugabe von 4-Chloro-1-naphtol (20 % (w/v) in Methanol) und Wasserstoffperoxyd. Die Herstellung polyklonaler Antikörperseren erfolgte bei der Firma Eurogentech (Belgien) durch subkutane Immunisierung von Kaninchen mit aufgereinigtem Fusionsprotein. Zur Bewertung des Antiköpers wurde sowohl Prä-Immunserum, als auch Serumfraktionen nach der ersten Immunisierung und nach dem Booster im Immunoblot getestet. Für die immunologischen Studien wurde dann das Ausblutungsserum verwendet.

Zur Verwendung von radioaktiv markiertem Protein wurde die Membran nach der Absättigung in 5 ml PBS mit 0,05 % Tween 20 (PBST) mit 150000 cpm ml<sup>-1</sup> (25  $\mu\text{Ci}$ ) des iodierten Proteins für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit PBS gewaschen und zur Signalentwicklung für mind. 3 Tage einem Röntgenfilm exponiert.

### 5.3.4 Proteindialyse

Um Proteine in andere Puffer zu überführen, wurde eine Dialyse gegen den gewünschten Puffer durchgeführt. Die Proteinlösung wurde in einen äquilibrierten Dialyseschlauch mit einer molaren Trenngrenze von 12-24 kDa überführt und über Nacht bei 4°C unter leichtem Rühren in 3 l des gewünschten Puffers dialysiert. Für das Umpuffern kleineren Proteinmengen (500 µl bis 3 ml) erfolgte die Dialyse über Nacht bei 4°C in Slide-A-Lyzer Kassetten mit MWCO von 10 kDa.

### 5.3.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

#### 5.3.5.1 Photometrische Messung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde photometrisch bei 280 nm durchgeführt, wobei hierbei der jeweilige Extinktionskoeffizient des Proteins berücksichtigt wurde. Der Extinktionskoeffizient der Enolase ist 0,75, d.h. eine  $OD_{280nm}$  von 1 entspricht  $1,3 \text{ mg ml}^{-1}$  Protein

#### 5.3.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Bei der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford handelt es sich um eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts einer Lösung. Sie basiert auf einer Farbveränderung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250, der an basische und aromatische Aminosäuren bindet. Zur Bradford-Bestimmung wurden von jeder Probe Dreifachbestimmungen in Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Standard zur Erstellung der Kalibriergeraden wurde eine seriellen Verdünnungsreihe aus Rinderserumalbumin (BSA) von  $12 \text{ µg ml}^{-1}$  bis  $4 \text{ mg ml}^{-1}$ . Es wurden in Dreierwerten jeweils 10 µl der BSA-Lösung bzw. der zu bestimmenden Probe mit jeweils 200 µl Bradford Reagenz (Bio-Rad) vermischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Intensität des Farbumschlags der Bradford-Reagenz bei 595 nm photometrisch vermessen und die Proteinkonzentration durch Abgleich mit den Meßwerten der Kalibriergeraden bestimmt.

### 5.3.6 Dot-spot-Analyse

Zur Untersuchung der Ligand-Rezeptor-Interaktion unter nativen Bedingungen wurden rekombinante und gereinigte Proteine in unterschiedlichen Konzentrationen ( $0,625 \text{ µg}$  –  $10 \text{ µg}$ ) auf eine Nitrozellulose Membran in konstantem Volumen von 2 µl getropft. Die Membran wurde an der Luft getrocknet. Die Membran wurde mit 10 % Magermilch in PBS für 2 h bei RT abgesättigt und analog zu der unter Punkt 5.3.3 beschriebenen Methode für einen Blot overlay mit Plasminogen und anti-Plasminogen Antikörpern verwendet. Als Kontrolle der Protein-Protein-Interaktion wurde in einem Parallelansatz eine zweite Dot-Spot-Membran mit äquivalenten Proteinmengen für einen Immunblot mit den für die verwendeten Proteine spezifischen Antikörpern eingesetzt. Um auch Bindungssignale kleinster Proteinmengen nachweisen zu können, wurde eine identisch angefertigte Dot-Spot-Membran mit  $150000 \text{ cpm ml}^{-1}$  an radioaktiv markiertem Plasminogen analog zu der unter 5.3.3 beschriebenen Methode behandelt.

### 5.3.7 N-terminale Sequenzanalyse

Zur Probenvorbereitung für die N-terminale Proteinsequenzierung wurden die Bakterienlysate in einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Konzentration des Trenngels wurde so gewählt, dass das gewünschte Protein nicht von anderen Proteinen mit ähnlichem Molekulargewicht überlagert wird. Die Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Ponceau-S reversibel angefärbt. Die entsprechende Proteinbande wurde präzise aus der Membran ausgeschnitten und von Frau Getzlaff aus der Abteilung Molekulare Strukturforschung, GBF mit einem „Applied Biosystem“ Gerät N-terminal sequenziert.

### 5.3.8 Analyse von Bindungskinetiken mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz- (SPR) Technik

Der Biosensor der Firma BIAcore ermöglicht unter Ausnutzung der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technik (SPR) die Analyse von Bindungsparametern spezieller Ligand-Rezeptor-Interaktionen. Dazu werden die Liganden über freie Aminogruppen kovalent an eine goldbeschichtete Carboxyldextranoberfläche eines Sensorchips gekoppelt. In einem Mikrofluidikapillarsystem werden die Analyte in Pufferlösung über die Chipoberfläche geleitet. Die Detektion von Bindungsereignissen erfolgt in Echtzeit durch einen Biosensor unter Verwendung von polarisierten Lichtstrahlen. Die Elektronendichtewellen der Goldschicht beeinflussen die Lichtwellen und bewirken eine Absorption des Lichts in einem bestimmten Winkel. Diese Absorption ist direkt abhängig von Massenverhältnissen auf der Chipoberfläche und wird als Resonanz in einem Sensorgramm graphisch dargestellt. Der Biosensor detektiert kleinste Änderungen im Absorptionswinkel.

#### 5.3.8.1 Ligandenimmobilisierung

Die Kopplung der unterschiedlichen Proteine erfolgte kovalent über die Aminogruppen (Nice *et al.*, 1996). Dazu wurden die Carboxylmethylgruppen der Gold-dextran-sensorchip-oberfläche mit 0,05 M N-Hydroxysuccinimide (NHS) und 0,2 M N-ethyl-N'-dimethylaminopropyl) carbodiimid) in Aktivester überführt. Zur Amidkopplung wurden 100-200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  des Liganden in 20 mM Na-Acetatpuffer eingesetzt. Der pH-Wert des Kopplungspuffers lag eine pH-Einheit unterhalb des isoelektrischen Punktes des Kopplungsproteins. Unter diesen Bedingungen erfolgt eine elektrostatische Preakkumulierung des Liganden mit der über pH 3 negativ geladenen Carboxyldextranschicht, da sämtliche Seitenketten protoniert vorliegen und der Ligand eine positive Nettoladung aufweist. Der Kopplungsverlauf wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 10  $\mu\text{l min}^{-1}$  bis zum Erreichen von ca. 1000 RU als einheitlicher Basiswert durchgeführt. Dies entspricht ca. 1 ng Protein. Zur Deaktivierung freier reaktiver Estergruppen wurde 1 M Ethanolaminhydrochlorid (pH 8,5) verwendet. Es wurden jeweils drei der vier Flusszellen des CM5-Sensorchips von BIAcore mit unterschiedlichen Liganden gekoppelt.

#### 5.3.8.2 Bindungsanalysen

Die Analyse der Bindungsinteraktionen erfolgte in HBS-EP-Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7.4). Die vierte Flusszelle diente als Referenzzelle zur Detektion der Eigenrefraktion des HBS-EP-Laufpuffers. Da der

Biosensor höchst spezifisch auf Änderungen der Puffereigenschaften reagiert, wurden die Analyte zuvor gegen den Laufpuffer dialysiert. Der Biosensor ist in Lage, Masseänderungen von 1 pg pro mm<sup>2</sup> (= 1 Resonanzunit [RU]) zu erfassen. Zur Untersuchung von Bindungskinetiken wurden die Analyte in 1:2-Verdünnungen zwischen 1 nM bis 500 nM durch die einzelnen Flusszellen des Sensorchips geleitet. Das BIAcore-Gerät 2000 ermöglicht hierbei die programmgesteuerte Automatisierung der Analytinjektionen und Renaturierungszyklen. Die Renaturierung der Chipoberfläche erfolgte mit jeweils 2 Injektionen 20 mM NaOH. Die vollständige Renaturierung der Sensorchipoberfläche wurde durch Abgleich der Basisresonanz vor und nach dem Bindungsereignis überprüft. Abweichungen durch Massentransporteffekte treten auf, wenn die Konzentration des Analyten in der Injektionslösung nicht ausreicht, um die vorhandenen Bindungsstellen am immobilisierten Liganden zu besetzen. Dies ist besonders bei niedrigen Analytkonzentrationen, niedrigen Flussraten und nach Ligandenimmobilisation in hohen Mengen möglich. Zur Vermeidung von Massentransportphänomenen wurde eine Flussgeschwindigkeit von 10 µl min<sup>-1</sup> gewählt.

### 5.3.8.3 Evaluierung der Bindungskinetiken

Zur Auswertung der Bindungskinetiken wurden die Algorithmen der BIAevaluation-software von BIAcore verwendet. Die Bestimmung des  $\chi^2$  im Rahmen der Standardabweichung und die Darstellung der "Residual Plots" waren hierbei ein Maß für die Güte der Evaluierung durch ein bestimmtes Bindungsmodell. Eine Beschreibung der in der Biacore-Software enthaltenen Reaktionsmodelle ist in Abschnitt 3.6.6 dargestellt. Anhand der für die eukaryotische Enolase veröffentlichten Formel zur Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeit wurde eine separate Analyse der Dissoziationsphasen vorgenommen (Andronicos *et al.*, 2000). Die Formel basiert auf der Grundlage einer 1:1-Langmuir-Interaktion mit Berücksichtigung von Konformationsänderung bzw. mehreren Bindungsereignissen und ermöglicht die Analyse der Dissoziationsphase ohne Berücksichtigung der Assoziation. Im folgenden sind die Formel und die verwendeten Parameter dargestellt.

$$R1 * \exp^{(-k_{d1} * (t-t_0))} + (R0-R1) * \exp^{(k_{d2} * (t-t_0))}$$

**R0:** Refraktion am Beginn des Evaluationsbereichs

**T0:** Zeitpunkt am Beginn des Evaluationsbereichs

**k<sub>d1</sub>:** 1. Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante [s<sup>-1</sup>]

**R1:** Refraktion am Ende des Evaluationsbereichs

**T1:** Zeitpunkt am Ende des Evaluationsbereichs

**k<sub>d2</sub>:** 2. Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante [s<sup>-1</sup>]

**t:** unabhängige Variable

Parameter	Startwert	Evaluierung
R0	0	Y max
T0	Konstant	X min
Kd1	$1 * \exp^{-4}$	Global
R1	0	Lokal
Kd2	$1 * \exp^{-4}$	Global

### 5.3.9 Proteinexpression

Zur Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* erfolgte zunächst eine Kultur der *E. coli*-Stämme in 500 ml LB-Medium unter Antibiotika-Selektionsdruck bei 37°C schüttelnd. Anschließend erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1 Volumen LB-Medium ohne Antibiotikum und 1 mM IPTG. Die Induktion erfolgte für 4-6 h schüttelnd bei 30°C. Da das exprimierte Protein intrazellulär angereichert wird, erfolgte nach der Sedimentation der Bakterien für 10 min bei 6000 x g die Aufnahme in 5 ml PBS mit 1 mM PMSF zur Proteaseinhibition. Die Bakterien-suspension wird zwei bis viermal bei einem konstanten Druck von 40000 psi mechanisch mittels einer vorgekühlten French® Pressure Cell (SLM Instruments) lysiert. Nicht-lysierte Bakterien und Zelltrümmer werden durch Zentrifugation für 15 min bei 6000 x g vom proteinhaltigen Überstand getrennt.

### 5.3.10 Proteinpräzipitation

#### 5.3.10.1 Fraktionierte Fällung von Membranproteinen (Hjelmeland, 1990)

Zur Isolierung von Membranproteinen von *Streptococcus pneumoniae* wurden 1 l Bakterienkultur in THY-Medium bei 37°C ruhend bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert und zweimal der mechanischen Lyse durch die French Press (SLM Amico) unterzogen. Zur Trennung der Zytosolproteine von Membranbestandteilen wurde das Bakterienlysats für 50 min bei 19000 x g zentrifugiert. Zur Solubilisierung der Membranproteine wurde das Sediment in 2 ml CHAPS-Inkubationspuffer resuspendiert und nacheinander für je 30 min bei 28°C mit steigenden Konzentrationen des hydrophoben zwitterionischen Detergenz CHAPS (5 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM) inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt erfolgte die Sedimentation der nicht-löslichen Bestandteile für 30 min bei 22000 x g und darauffolgend die Inkubation mit der nächsthöheren CHAPS-Konzentration. Die Überstände wurden über Nacht gegen PBS dialysiert und ihr Proteingehalt im Polyacrylamidgel bestimmt. Zur Aufkonzentrierung der Zytosolproteine im Überstand der Pneumokokkenlysats wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatpräzipitation durchgeführt.

#### 5.3.10.2 Ammoniumsulfatpräzipitation

Die Ammoniumsulfatfällung ermöglicht die Präzipitation von Proteinen ohne Verlust der biologischen Aktivität und Struktur. Proteingemische wurden durch Zugabe von gesättigter Ammoniumsulfatlösung (4,1 M) in steigender Endkonzentration (20, 40, 60 und 80 %) jeweils für 30 min inkubiert. Anschließend werden die gefällten Proteine

durch Zentrifugation bei 19000 x g sedimentiert und der Überstand mit der nächsthöheren Konzentration an Ammoniumsulfat inkubiert. Das benötigte Volumen an Ammoniumsulfatlösung für eine bestimmte Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$[C_0V_0 - C_cV_0] / C_i - C_a = V_a$$

- C<sub>0</sub>:** Anfangskonzentration (% Sättigung)  
**C<sub>i</sub>:** Endkonzentration (% Sättigung)  
**C<sub>a</sub>:** Ammoniumsulfatlösung (%)  
**V<sub>0</sub>:** Anfangsvolumen  
**V<sub>a</sub>:** Volumen der zugegebenen Ammoniumsulfatlösung

### 5.3.10.3 TCA-Präzipitation von Kulturüberständen

Die Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA) wurde angewandt, um sämtliche Proteinbestandteile im Überstand von Pneumokokkenkulturen zu konzentrieren. Die TCA-Fällung bewirkt hierbei eine Degradierung der Proteine, so dass enzymatische Aktivitäten nicht mehr nachweisbar sind. Da Antigendeterminanten erhalten bleiben, ist diese Methode für das Konzentrieren von Proteinen für eine Westernblot-Analyse geeignet. Nach Kultivierung einer 20 ml Pneumokokkenkultur in THY-Medium bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,7 bei 37°C erfolgte die Sedimentation der Bakterien bei 6000 x g. Der Überstand wurde abgenommen und mit einer Endkonzentration von 10 % TCA über Nacht bei 4°C präzipitiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 19000 x g wurde das Präzipitat zur Neutralisierung in 1 ml PBS resuspendiert. Im Anschluss daran erfolgte eine Dialyse gegen PBS.

### 5.3.11 Methoden zur Proteinaufreinigung

#### 5.3.11.1 Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)

Zur Aufreinigung der Enolase aus dem Bakterienlysat wurde eine Anionenaustauschchromatographie vorgenommen. Hierzu wurde der proteinhaltige Überstand nach mechanischer Lyse über MonoQ HR 5/5 bzw. Mono G HR 10/10 Säulen (Pharmacia) gegeben. Proteine mit negativer Nettoladung haben an den reaktiven –CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Gruppen des Säulenmaterials gebunden und konnten durch Zugabe von Chloridionen verdrängt und eluiert werden. Um das gewünschte Protein von den übrigen Verunreinigungen zu trennen, erfolgte die Elution im Rahmen eines NaCl-Gradienten, der eine gezielte Elution einer bestimmten Proteinfraktion ermöglichte. Der Chromatographie-Verlauf wurde mit Hilfe des Computerprogramms „FPLC-Director“ gesteuert. Die Veränderung der Proteinkonzentrationen im Eluat wurde durch photometrische Vermessung bei 280nm in Echtzeit verfolgt. Anschließend wurde die Proteineluatfraktion zur Abtrennung des Elutionssalzes in einer semipermeablen Membran über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert.

### 5.3.11.2 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie zur Aufreinigung rekombinanter Proteine erfolgte mit Hilfe des „Econo-Systems“ der Firma Bio-Rad. Durch die Klonierung von Genen bzw. Genfragmenten in den Expressionsvektor pQE30 enthielten die exprimierten Proteine am aminoterminalen Ende einen Anhang von 6 Histidinen am Aminoterminus. Diese Histidine ermöglichten durch seine hohe Affinität zu Nickelionen die Aufreinigung über Ni-NTA (Nitrilo-tri-Essigsäure)-Agarose. Zur Isolierung rekombinanter Proteine aus Bakterienlysaten wurde die mechanisch lysierte Bakterienkultur in 10 ml Chromatographiepuffer (50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8.0) mit 1 mM PMSF resuspendiert und für 15 min bei 8000 x g sedimentiert. Der klare Überstand wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml min<sup>-1</sup> über eine Ni-NTA-Agarose-Säule (5 ml Bettvolumen) gegeben. Die Proteinkonzentration des Säulendurchflusses wurde bei 280 nm photometrisch verfolgt. Durch Waschen der Säule mit 20 mM Imidazol in Chromatographiepuffer bis zum Erreichen der Basislinie wurden am Säulenmaterial haftende Lysatreste entfernt. Anschließend erfolgte die Elution des an der Nickel-NTA-Agarose gebundenen Proteins durch die Verdrängung des Proteins mit 250 mM Imidazol in Chromatographiepuffer. Die Eluate wurden fraktioniert aufgefangen und den Proteingehalt im 12 % SDS-Gel überprüft. Die Fraktionen wurden entsprechend ihrer Proteinkonzentration und Reinheit vereinigt und über Nacht bei 4 °C gegen PBS dialysiert.

### 5.3.12 Bindungsanalyse mit synthetischen Peptiden auf Spot Membranen (Frank 1992; 1995)

Zur Bestimmung von Bindungssepitopen durch Analyse von kleineren Peptidsequenzen eines Proteins wurden anhand der Primärsequenz Peptide aus jeweils 15 Aminosäuren synthetisiert und auf einen Nitrozellulosefilter gekoppelt. Die Peptide wiesen eine Sequenzverschiebung von 3 Aminosäuren auf. Die Aminosäuresequenz der  $\alpha$ -Enolase von *Streptococcus pneumoniae* diente als Grundlage für die Herstellung der Spot Membran. Zur Eingrenzung eines potentiellen internen Bindungsmotivs wurde eine zweite Membran erstellt. Die Peptide dieser Membran enthielten zwischen 4 und 15 Aminosäuren. Mit einer Sequenzverschiebung von einer Aminosäure repräsentierten die Peptide systematisch den Bereich zwischen des Aminosäuren 232 und 267 der Enosequenz. Für eine dritte Spot-Membran wurden die Aminosäuren der Peptidsequenz „FYDKERKVY“ systematisch an jeder einzelnen Position mit jeweils einer der 20 möglichen Aminosäuren substituiert. Diese Membran diente zur Identifikation der für die Bindung an Plasminogen wichtigen Aminosäuren in dem Peptid. Die Herstellung der Spot-Membranen des Eno-Proteins erfolgte von Herrn R. Frank, Arbeitsgruppe „Molekulare Erkennung“ der GBF (Frank, 1992 und 1995). Zur Bindungsanalyse wurden diese Filter zunächst mit Ethanol befeuchtet und anschließend dreimal mit TBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde der Filter über Nacht bei RT in 10 ml Absättigungspuffer (2 ml Blockingsolution von Genosys, 0,5 % Saccharose, 8 ml T-TBS, pH 7.0) geschwenkt. Nach einem Waschschriff mit 10 ml T-TBS (TBS mit 0,05% Tween 20) wurde der Filter für mindestens 4 h mit 40 µg ml<sup>-1</sup> Proteinlösung in PBS bei RT inkubiert. Freies Protein wurde durch dreimaliges Waschen für 10 min mit jeweils 10 ml T-TBS entfernt. Anschließend wurde der Filter mit dem für das verwendete Protein spezifischen Erstantikörper in



einem Verdünnungsverhältnis von 1:100 in 5 ml Absättigungspuffer für 3h inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit jeweils 10 ml T-TBS und die Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper in einem Verdünnungsverhältnis von 1:200 in 5 ml Absättigungspuffer für 1,5 h bei RT. Danach wurde der Filter zweimal mit 10 ml T-TBS und zweimal mit PBS gewaschen. Die Entwicklung der Bindungssignale erfolgte durch Zugabe von Chloronaphthol und Wasserstoffperoxyd wie unter 5.3.3 beschrieben. Die Signalstärke wurde densitometrisch ausgewertet. Zur Feststellung unspezifischer Hintergrundsignale wurden die Filter vor der eigentlichen Bindungsanalyse nur mit dem Zweitantikörper inkubiert bzw. mit dem Erst- und dem Zweitantikörper und mit Chloronaphthol entwickelt. Durch die im folgenden beschriebene Waschprozedur wurde der Filter nach jedem Bindungsversuch gesäubert und renaturiert. Dazu wurde der Filter zunächst dreimal mit ddH<sub>2</sub>O und einmal mit DMF gewaschen. Nach Sonifikation des Filters für 15 min im Ultraschallbad bei RT, folgte ein Waschschrte mit DMF und drei Waschschrte mit ddH<sub>2</sub>O. Anschließend wurde der Filter dreimal mit Puffer A gewaschen, wobei jeder Waschschrte eine 5 min Inkubation im Ultraschallbad enthielt. Zuletzt wurde der Filter dreimal mit Puffer B gewaschen und dreimal mit Ethanol abs. renaturiert. Der Filter wurde dann entweder sofort für eine erneute Absättigung vorbereitet oder getrocknet und zur Aufbewahrung bei -20°C aufbewahrt.

### 5.3.13 Enzymatische Methoden

#### 5.3.13.1 $\alpha$ -Enolase-Enzym-Aktivitätstest

Das rekombinante Protein Enolase wurde in einem Enzymaktivitätstest auf die Fähigkeit zur Umsetzung des natürlichen Substrats 2-Phosphoglycerinäure (2-PGE) zu Phosphoenolpyruvat (PEP) hin untersucht. Dazu wurden 2 bis 18  $\mu$ g Enolase in 5  $\mu$ l HEPES-Puffer zu 995  $\mu$ l einer 3 mM 2-PGE-Lösung in HEPES-Puffer gegeben und 3 min inkubiert. Das Produkt der Umsetzungsreaktion, Phosphoenolpyruvat absorbiert UV-Licht bei 240 nm Wellenlänge. Als Kontrolle wurde das SpsA-Protein anstelle der Enolase auf Umsetzung von 2-PGE untersucht. Zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität auf der bakteriellen Oberfläche wurde der „coupled Assay“ durchgeführt. Eine 50 ml THY-Kultur von *S. pneumoniae* wurde bei 37°C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultiviert, für 15 min bei 8000 x g sedimentiert und einmal mit 100 mM HEPES-Puffer pH 7.0 gewaschen. Das Sediment wurde in 1 ml HEPES-Puffer resuspendiert. 100  $\mu$ l der Bakteriensuspension wurde mit 200  $\mu$ l 3 mM 2-PGE in HEPES-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 7,7 mM KCl für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation der Suspension für 5 min bei 8000 x g wurde der Überstand seriell in 6 Schritten jeweils im Verhältnis 1:2 in HEPES-Puffer verdünnt. Jeweils 100  $\mu$ l der Überstandverdünnung wurde zusammen mit 850  $\mu$ l Enzym-Reaktionspuffer (3,3 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,3 mM 2-PGE, 1,2 mM ADP, 10,3 U Lactatdehydrogenase, 2,7 U Pyruvatkinase) in einer Quarzküvette gegeben. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 50  $\mu$ l NADH gestartet. Bei Umsetzung des 2-PGE wird das Produkt PEP durch die Pyruvatkinase und die Lactatdehydrogenase unter Verwendung der Protonen des NADH enzymatisch weiter umgesetzt. Die Abnahme der NADH Konzentration im Reaktionsablauf wurde im Photometer bei 240 nm verfolgt und in 15 sek. Intervallen protokolliert. Zur Datenauswertung wurden die Mittelwerte aus drei identischen Versuchsansätzen gebildet. Zur Kontrolle wurde der Überstand im Reaktionspuffer vor Zugabe von NADH vermessen. Um einen

Reaktionsablauf durch Enzymverunreinigungen auszuschließen wurde die Abnahme an NADH im Reaktionspuffer ohne Zugabe von Bakterienüberstand gemessen. Die Ermittlung der Enzymparameter  $K_M$  und  $V_{max}$  erfolgten nach der Gleichung:

$$V = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_M}$$

**V:** Reaktionsgeschwindigkeit [ $M \times l^{-1} \times min^{-1}$ ]

**$V_{max}$ :** maximale Reaktionsgeschwindigkeit

**[S]:** Substratkonzentration [M]

**$K_M$ :** Michaeliskonstante [ $M \times l^{-1}$ ], (Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit)

### 5.3.13.2 Plasminogen-Substrat-Assay

Die Aktivierung von Plasminogen zur Serinprotease Plasmin bewirkt eine Spaltung des Chromophors D-Val-Leu-Lys-p-DiNitroanilid (S-2251, Fluka), die zu einer verstärkten Absorption bei 405 nm Wellenlänge führt. Zur Feststellung der Plasminogenprozessierung durch die Enolase, wurde Protein Eno in Konzentrationen von 10 ng, 100 ng, 1 µg, 5 µg 10 µg und 50 µg in 40 µl 50 mM Tris-HCl pH 7.5 zu 1 µg Plasminogen (20 µg ml<sup>-1</sup> in 0,01 % Triton X-100) gegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Lösungen wurden jeweils als Dreieransätze mit 30 µl Substratlösung (0,32 M Tris-HCl pH 7.5, 1,77 M NaCl, 1 mg S-2251) inkubiert und die Reaktion sofort bei 405 nm im ELISA-Reader (Titertek Fluoroscan II, Bio-Rad) vermessen. Als Positivkontrolle wurde Plasmin verwendet. Zur Detektion von Enzymverunreinigungen wurde die Substratlösung mit Plasminogen ohne Zugabe von Eno vermessen.

### 5.3.13.3 Enzymatische Behandlung von Pneumokokken

Zur Eingrenzung der chemischen Natur der Plasminogenrezeptoren auf der Oberfläche von Pneumokokken wurden intakte Bakterien mit unterschiedlichen Enzymen behandelt und anschließend auf Plasminogenbindung getestet. Hierzu wurde eine bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultivierte THY-Flüssigkultur von *S. pneumoniae* sedimentiert und auf eine Bakteriendichte eingestellt, die einer Transmission von 10 % entsprach. 2 ml dieser Bakteriensuspension wurden mit 0,1 IU Neuraminidase in PBS für 30 min bei 37°C ruhend inkubiert. In einem Parallelansatz wurde die Bakteriensuspension mit 125 IU Hyaluronidase in PBS für 30 min bei 37°C ruhend inkubiert. Durch Sedimentation und Waschen der Bakterien mit PBS wurde die enzymatische Behandlung beendet. In einem weiteren Ansatz wurde durch Inkubation der Pneumokokken mit 0,05 % Glutaraldehyd eine kovalente Quervernetzung der Aldehydgruppen der Kapselpolysaccharide mit den Aminogruppen von Proteinen ausgelöst. Außerdem erfolgte eine Inkubation einer Bakteriensuspension mit Trypsin bzw. Pronase E jeweils für 30 min mit 100 µg

Trypsin bzw. mit 100 µg Pronase E für 15 min bei 37°C in Phosphatpuffer. Bei Trypsin handelt es sich um eine Serin-Endopeptidase, während Pronase E ein Enzymgemisch aus unspezifischen Endo- und Exopeptidasen ist. Zum Abstoppen der Trypsinreaktion wurde anschließend 250 µg Trypsininhibitor zur Bakteriensuspension gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Nach Pronase E –Behandlung wurden die Bakterien sedimentiert und einmal mit Phosphatpuffer gewaschen. Die mit den unterschiedlichen Enzymen behandelten Pneumokokken wurden anschließend im Radioaktiv-Bindungsversuch auf die verbliebenen Bindungseigenschaften an <sup>125</sup>I-Plasminogen getestet bzw. einer Blot-overlay-Analyse unterzogen.

#### **5.3.13.4 Carboxypeptidase B-Inkubation von Pneumokokken**

Bei Carboxypeptidase B handelt es sich um eine Zink-Metalloprotease mit Endopeptidaseaktivität. Sie spaltet spezifisch carboxyterminale- Lysine und Arginine von Proteinen. Die Pneumokokkenstämme R6x und ATCC11733 wurden bis zum Erreichen der spätlogarithmischen Phase in 30 ml THY-Medium bei 37°C kultiviert. Danach wurden die Bakterien bei 8000 x g sedimentiert und in 3 ml TES-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 1 mg Lysozym und 20 µl Mutanolysin. Jeweils 500 µl der lysierten Bakteriensuspension wurde für 1 h bei 37 °C mit 0,1 U, 1 U, 10 U und 20 U Carboxypeptidase B inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 20 µl Proteinprobenpuffer gestoppt. Jeweils 10 µl der Lysatfraktionen wurden mit unbehandeltem Lysat als Kontrolle im SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran. Diese Membran wurde mit radioaktiv markiertem Plasminogen inkubiert. Um die C-terminalen Lysine aller auf der Oberfläche intakter Pneumokokken vorhandenen Proteine abzuspalten, wurden 400 µl einer auf 10 % Transmission eingestellten Bakterienkultur in spätexponentieller Phase für 30 min bei 37 °C mit 0,1 U, 1 U, 10 U und 20 U Carboxypeptidase B inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 55 nCi iodiertem Plasminogen in einem Volumen von 25 µl und eine weitere Inkubation für 45 min bei RT. Nach Zugabe von PBST erfolgte die Messung der Plasminogenbindung wie unter 4.3.15.2 beschrieben. Die Carboxypeptidase-B-Inkubation von Proteinen, die mit Hilfe des Detergenz CHAPS aus der Membran gelöst wurden, erfolgte auf gleicher Weise nach beschriebenen Protokoll. Die spezifische Hydrolyse von aromatischen und aliphatischen Seitenketten am Carboxyterminus durch Carboxypeptidase Y wurde analog zu der Vorgehensweise mit Carboxypeptidase B durchgeführt. Die Carboxypeptidase Y ist eine Exopeptidase mit Serinproteaseaktivität am Carboxyterminus von Proteinen.

#### **5.3.14 Methoden für Versuche mit radioaktiv markierten Proteinen**

##### **5.3.14.1 Markierung von Proteinen mit <sup>125</sup>Iod (Hunter und Greenwood, 1962)**

Zur radioaktiven Markierung von Proteinen mit dem Isotop <sup>125</sup>Iod wurden 100 µg Protein in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7.5 in silikonisierte Glasröhrchen gegeben. Nach Zugabe von 350 µl <sup>125</sup>Iod (~ 0,5 mCi) erfolgte mit 20 µl frisch gelöstem Chloramin T (1 mg ml<sup>-1</sup> in Phosphatpuffer) für 5 min die Oxidationsreaktion. Zum Beenden der Reaktion wurden 20 µl Na-Metabisulfid (1 mg ml<sup>-1</sup>) zugegeben. Die Reaktionslösung

wurde mit 2,5 ml PBS mit 0,05 % Tween 20 aufgefüllt und auf eine PD 10-Säule (Pharmacia) geladen. Die PD-10 Säule wurde anschließend einmal mit PBST gewaschen und das iodidierte Protein mit 3,5 ml PBST eluiert. Die radioaktive Proteinlösung wurde aliquotiert und max. für 2 Wochen bei 4°C aufbewahrt

#### **5.3.14.2 Bindungsversuch mit $^{125}\text{I}$ -markiertem Protein**

Nachdem die Bakterienstämme bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,4 bei 37°C in THY kultiviert worden waren, wurden sie für 15 min bei 8000 x g sedimentiert. Die Bakterien wurden in PBS mit 0,05 % Tween 20 resuspendiert und photometrisch auf eine Bakteriendichte von  $10^9$  KFE  $\text{ml}^{-1}$  (10 % Transmission) eingestellt. Jeweils 400  $\mu\text{l}$  dieser Suspension wurde mit 45 nCi radioaktiv markierter Proteinlösung (mit 10-20 ng Protein) für 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 600  $\mu\text{l}$  PBST (PBS mit 0,05 % Tween 20) beendet und die Bakterien für 10 min bei 19000 x g sedimentiert. Der Überstand mit nicht gebundener Radioaktivität wurde abgezogen und die verbliebene Radioaktivität im Gamma-Counter gemessen. Zur Quantifizierung der Bindung wurde der Maximalwert bestimmt. Dazu wurde das iodidierte Protein ohne Bakteriensuspension 45 min bei RT inkubiert und vor der cpm-Messung durch Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  FCS und 1 ml 10 % Trichloressigsäure präzipitiert. Die Berechnung der Bindung in Prozent erfolgte durch Korrelation der Messwerte mit dem Maximalwert und war ein Maß für die Menge an gebundenem markiertem Protein. Der Grenzwert für eine positiv bewertete Bindung wurde bei 5 % Bindung gesetzt. Als Berechnungsgrundlage wurden die Mittelwerte aus jeweils drei identischen Versuchsansätzen gebildet. Die Feststellung des Fehlerquotienten erfolgte durch Bestimmung der Standardabweichung.

#### **5.3.14.3 Inhibitionsstudien mit radioaktiv markierten Proteinen**

Um festzustellen, ob die Bindung des radioaktiv markierten Proteins an die Oberfläche von Bakterien durch andere Proteine kompetitiv inhibiert werden konnte, wurden die auf eine Zelldichte von  $10^9$  KFE  $\text{ml}^{-1}$  eingestellten Bakteriensuspension mit verschiedenen Konzentrationen der möglichen Inhibitorproteine (0,1  $\mu\text{g}$  bis 50  $\mu\text{g}$ ) für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  des iodierten Proteins (45 nCi, 100000 cpm) zu jedem Ansatz und eine weitere Inkubation für 25 min bei RT. Die Detektion der Bindung des radioaktiven Proteins erfolgte wie unter Punkt 5.3.14.2 beschrieben.

#### **5.3.15 Elektronenmikroskopie**

Die elektronenmikroskopischen wurden zur Lokalisation der Proteine auf der Oberfläche und im Zellinneren von Pneumokokken und zur Visualisierung der Plasminogenbindung durchgeführt. Nach Vorbereitung der Bakterienkulturen und Abschluss der Inkubationsprozeduren wurde die weitere Einbettung und Visualisierung im Elektronenmikroskop von Dr. Manfred Rohde und Ellruth Müller durchgeführt.

Zur Detektion der Plasminogenbindung auf der Oberfläche von *Streptococcus pneumoniae* wurden feldemissionsrasterelektronenmikroskopische (FESEM)-Studien mit den Pneumokokkenisolaten R6x und ATCC 11733 durchgeführt. *S. pneumoniae* Kulturen wurden bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4 in THY-Medium bei 37°C kultiviert und anschließend bei 8000 x g sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Zelldichte der Bakteriensuspension auf 10<sup>9</sup> KFE ml<sup>-1</sup> in PBS eingestellt und zur Absättigung für 30 min mit fötalem Rinderserum (FCS, fetal calf serum) inkubiert. Zur Analyse der Plasminogenbindung wurden 2 ml der Bakteriensuspension mit 20 µg humanem Plasminogen für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und für weitere 30 min bei 37°C mit anti-Plasminogen-Antikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden 15 nm Protein A / G-Goldpartikel (BioCell, Cardiff) zur Detektion der anti-Plasminogen-Antikörper zur Suspension gegeben. Die Fixierung der Bakterien erfolgte mit 1 % Formaldehyd in PBS für 30 min bei RT. Nach der Kritischen-Punkt-Trocknung mit flüssigem CO<sub>2</sub> wurden die Bakterien anschließend auf Kohlebedampfte Formvargrids adsorbiert, wiederholt mit TE-Puffer und destilliertem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Die präparierten Proben wurden in einem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (DSM 982 Gemini, Zeiss) im low voltage mode bei einer Beschleunigungsspannung zwischen 1,5 und 2 kV mittels eines Everhart-Thornley SE Detektors analysiert.

#### 5.3.15.1 „Pre-embedding labeling“ Studien

Zur Lokalisation der Plasminogenbindung auf der bakteriellen Oberfläche wurden transmissionselektronenmikroskopische Studien durchgeführt. Dazu erfolgte die Probenvorbereitung nach dem pre-embedding-labeling-Verfahren.

*S. pneumoniae* Kulturen wurden nach beschriebenem Protokoll kultiviert und nach Absättigung mit FCS mit Plasminogen und anti-Plasminogen Antikörpern inkubiert. Nach den Inkubationsschritten wurden die Bakterien mit 2 % Formaldehyd und 2 % Glutaraldehyd in PBS für 30 min auf Eis fixiert. Anschließend erfolgte die Einbettung in 2 % Wasseragar. Nach der Fixierung mit 1 % Osmiumtetroxid für 1 h bei RT erfolgte eine schrittweise Entwässerung mit Aceton. Im Anschluss daran folgte die Einbettung in das Epoxidharz nach Spurr (Spurr, 1969). Das Harz wurde für 8 h bei 70°C polymerisiert. Nach der Herstellung von Ultradünnschnitten wurde eine Nach Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat durchgeführt. Die Analyse der Plasminogenbindung erfolgte im Transmissionselektronenmikroskop (TEM910, Zeiss) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV.

Zur Vorbereitung der parallel durchgeführten rasterelektronenmikroskopischen Studien wurden die Bakterien nach der Antikörperinkubation und Inkubation mit Protein A/G Gold Komplexen für 5 min auf Poly-L-Lysin-beschichtete Coverslips adsorbiert. Nach einem Waschschrift mit TE-Puffer wurden die Bakterien 15 min bei RT mit 3 % Glutaraldehyd fixiert. Anschließend erfolgte die schrittweise Entwässerung mit Aceton und anschließend die Kritische-Punkt-Trocknung mit flüssigem CO<sub>2</sub>.

#### 5.3.15.2 „Post-embedding labeling“ Studien

In post-embedding-labeling Studien erfolgte die Detektion des Eno-Proteins in unterschiedlichen Kompartimenten von *S. pneumoniae*.

Die Kultur und Sedimentation der Bakterien erfolgte wie unter Punkt 3.3.16 beschrieben. Nach dem Waschen in PBS wurden die Bakterien mit 0,2 % Glutaraldehyd und 0,5 % Formaldehyd in PBS für 1 h auf Eis fixiert. Die fixierte Bakteriensuspension wurde anschließend mit 10 mM Glycin in PBS zur Absättigung freier Aldehydgruppen gewaschen und in 2 % Wasseragar eingebettet. Der Agar wurde dann in kleine Würfel (2 mm) geschnitten und schrittweise in serieller Ethanolverdünnung entwässert. Anschließend erfolgte die Einbettung in das Acrylat-Harz LR White Harz (London Resin Company). Die Polymerisation erfolgte bei 50 °C für 24 h. Im Anschluss daran wurden Ultradünnschnitte angefertigt und auf Formvar beschichtete 300-Maschen Nickel-Grids aufgenommen. Die Schnitte wurden dann für 12 h bei 4°C mit anti-Eno-Antiserum (100 µg ml<sup>-1</sup>) inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS erfolgte für 5 min die Absättigung mit 0,4 % Magermilch. Die Schnitte wurden durch Abtupfen an Filterpapier getrocknet und danach für 30 min mit einer 1:100 verdünnten Lösung der Protein A Gold Komplexe mit einer Partikelgröße von 10 nm inkubiert. Nach der Inkubation wurde mit PBS mit 0,01 % Tween 20 gewaschen und mit 4% wässrigem Uranylacetat nachkontrastiert. Die Proben wurden dann im Transmissionselektronenmikroskop (TEM, EM910, Zeiss) bei einer Spannung von 80 kV analysiert.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

**Aisen P., Leibmann A. (1972)** Lactoferrin and transferrin: a comparative study. *Biochem. Biophys. Acta* **257** (2): 314-323.

**Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1994)** Molecular Biology of the Cell. 3rd ed., Garland Publishing, Inc. New York & London.

**AlonsoDeValesco E., Verheul A.F.M., Verhoef J., Snippe H. (1995)** *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis and Vaccines. *Micobiol. Rev.* **59**: 591-603.

**Alloush H. M., Lopez-Ribot J.L., Masten B.J., Chaffin, W.L. (1997)** 3-Phosphoglycerate kinase: a glycolytic enzyme protein present in the cell wall of *Candida albicans*. *Microbiology* **143**: 321-330.

**Andersson B., Dahmen J., Torbjörn F., Leffler H., Magnusson G., Noori G., Svanborg Eden C. (1983)** Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. *J. Exp. Med.* **158**: 559-570.

**Andronicos N.M., Baker M.S., Lackmann, Ranson M. (2000)** Deconstructing the interaction of glu-plasminogen with its receptor  $\alpha$ -enolase. *Fibrinolysis & Proteolysis* **14**(6): 327-336.

**Angiolella L., Faccin M., Stringaro A., Maras B., Simonetti N., Cassone A. (1996)** Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. *J. Infect. Dis.* **173**: 684-690.

**Anglés-Cano E. (1994)** Overview on fibrinolysis: plasminogen activation pathways on fibrin and cell surfaces. *Chem. Physics lipids* **67/68**: 353-362.

**Anglés-Cano E., Rouy D., Lijnen H.R. (1992)** Plasminogen binding by  $\alpha$ 2-antiplasmin and histidine-rich glycoprotein does not inhibit plasminogen activation at the surface of fibrin. *Biochem. Biophys. Acta* **1156**: 34-42.

**Appelbaum P.C. (1992)** Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin. Infect. Dis.* **15**: 77-83.

**Appelbaum P.C., Bhamjee J.N., Scragg J.N., Hallet A.J., Bowen A.F. und Cooper R.C. (1997)** *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. *Lancet* **ii**: 995-997.

**Arni R.K., Padmanabhan K., Padmanabhan K.P., Wu T.P., Tulinsky A. (1993)** Structures of the noncovalent complexes of human and bovine prothrombin fragment 2 with human PPACK-thrombin. *Biochemistry* **32**: 4727-4637.

**Arza B., Felez J., Lopez-Aleman R., Miles L.A., Munoz-Canoves P. (1997)** Identification of an epitope of  $\alpha$ -enolase (a candidate plasminogen receptor) by phage display. *Thromb. Haemost.* **78**: 1097-1103.

**Atkinson R.A., Williams R.J.P. (1990)** Solution of the  $\epsilon$ -aminohexanoic acid complex of human plasminogen by H nuclear magnetic resonance spectroscopy and distance geometry. *J. Mol. Biol.* **212**: 541-552.

**Austrian R., Howie V.M. und Ploussard J.H. (1977)** The bacteriology of pneumococcal otitis media. *John Hopkins Med. J.* **141**: 104-111.

**Austrian R. (1986)** Some aspects of the pneumococcal carrier state. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **18**: 35-45.

**Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M. (1944)** Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* **79**: 137-158.

- Baldo B.A., Baker R.S. (1988)** Inhalant allergies to fungi: reactions to bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and identification of bakers' yeast enolase as an important allergen. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **86**: 201-208.
- Banyai L., Patthy L. (1985)** Proximity of the catalytic region and the kringle 2 domain in the closed conformer of plasminogen. *Biochem. Biophys. Acta* **832**: 224-227.
- Barnathan E.S., Kuo A., Kariko K., Rosenfeld L., Murray S.C., Behrendt N., Ronne E., Weiner D., Henkin J., Cines D.B. (1990)** Characterization of human endothelial cell urokinase-type plasminogen activator receptor protein and messenger RNA. *Blood* **76**: 1786-1795.
- Barnhart M.I., Riddle J.M. (1963)** Cellular localization of profibrinolysin (plasminogen). *Blood* **21**: 306.
- Ben Nasr A., Wistedt A., Ringdahl U., Sjöbring U. (1994)** Streptokinase activates plasminogen bound to human group C and G streptococci through M-like proteins. *Eur. J. Biochem.* **222**: 267-76.
- Berge A., Sjöbring U. (1993)** PAM, a novel plasminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.* **268**(34): 25417-24.
- Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (1986)**
- Bergmann S., Rohde, M., Chhatwal G. S., Hammerschmidt S. (2001)** Molecular Microbiology a-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol. Microbiol.* **40**: 1273-1287.
- Berry A.M., Paton J.C. (2000)** Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect. Immun.* **68**: 133-140.
- Berry A.M., Paton J.C. (1996)** Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**: 5255-62.
- Berry A.M., Lock R.A., Hansman D., Paton J.C. (1989)** Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **57**: 2324- 2330.
- Beyon I.J., Llinás M. (1991)** Solution structure of the tissue-type plasminogen activator kringle 2 domain complexed to 6-aminohexanoic acid an antifibrinolytic drug. *J. Mol. Biol.* **222**(4): 1035-51.
- Birnboim H.C., Doly J. (1984)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acid Res.* **7**: 1513-1523.
- Blasi F. (1988)** Surface receptors for urokinase plasminogen activator. *Fibrinolysis* **2**: 73-84.
- Blobel G. (1980)** Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 1496-1500.
- Böttger E.C. (1988)** High-efficiency generation of plasmid cDNA libraries using electro-transformation. *Biotechniques* **6**: 878-880.
- Borza D.-B., Morgan W.T. (1997)** Acceleration of plasminogen activation by tissue-plasminogen activator on surface bound histidine-rich glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **272**: 5718-5726.
- Boulnois G.-J. (1992)** Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 249-259.
- Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitiv method for the quantification of microgram quantities of protein using the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248.
- Brandis H., Köhler W., Eggers H.J., Pulverer G. (1994)** Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie, 7. Auflage.
- Breiman R.F., Butler, J.C., Tenover, F.C., Elliot, J.A., Facklam, R.R. (1994)** Emergence of drug-resistance pneumococcal infections in the United States. *JAMA* **271**: 1831-1835.



- Brewer J.M., Ellis P.D. (1983)**  $^{31}\text{P}$ -NMR studies of the effect of various metals on substrate binding to yeast enolase. *J. Inorg. Biochem.* **18**: 71-82.
- Briles D.E., Yother J., Mc Daniels L.S. (1988)** Role of pneumococcal surface protein A in the virulence of *streptococcus pneumoniae*. *Rev. Infect. Dis.* **10**: 372-374.
- Brown C.K., Kuhlman P.L., Mattingly S., Slates K., Calie P.J., Farrar W.W. (1998)** A model of the quaternary structure of enolases, based on structural and evolutionary analysis of the octameric enolase from *Bacillus subtilis*. *J. Protein Chem.* **17**(8): 855-866.
- Brown J.H. (1919)** The use of blood agar for the study of streptococci. New York, The Rockefeller Institut for Medical Research, Monograph No **9**: 122.
- Broxmeyer H.E., Smithyman A., Eger R.R., Meyers P.A., de Sousa M. (1978)** Identification of lactoferrin as the granulocyte-derived inhibitor of colony-stimulating activity production. *J. Exp. Med.* **148**(8): 1052-1067.
- Bruyn G.A.W., Zegers B.J.M., Van Furth R. (1992)** Mechanisms of host defense against infection with *streptococcus pneumoniae*. *Clinic. Infect. Dis.* **14**: 251-262.
- Bürgin J., Schaller J. (1998)** Expression, isolation and characterization of a mutated human plasminogen kringle 3 with a functional lysine binding site. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**: 135-141.
- Burman L.A., Norrby R., Trollfors B. (1985)** Invasive pneumococcal infections: incidence, predisposing factors and prognosis. *Rev. Infect. Dis.* **7**: 133-142.
- Butler J.C. (1997)** Epidemiology of pneumococcal serotypes and conjugate vaccine formulations. *Microb. Drug. Resist.* **3**: 125-129.
- Byeon I.-J., Llinás M. (1991)** Solution structure of the tissue-type plasminogen activator kringle 2 domain complexed to 6-aminohexanoic acid, an antifibrinolytic drug. *J. Mol. Biol.* **222**: 1035-1051.
- Calvin N. M., Hanawalt P. C. (1988)** High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* **170**: 2796-2801.
- Cámara M., Boulnois G.J., Andrew P.W., Mitchell T.J. (1994)** A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect. Immun.* **62**(9): 3688-3695.
- Carlin B., Jaffe R., Bender B., Chung A.E. (1981)** Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **256**(10): 5209-14.
- Cesarman G. M., Guevara C. A., Hajjar K. A. (1994)** An endothelial cell wall receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II AnnexinII-mediated enhancement of t-PA dependent plasminogen activation. *J. Biol. Chem.* **269**: 21198-21203.
- Chang Y., Mochalkin I., McCance S.G., Cheng B., Tulinsky A., Castellino F.J. (1998)** Structure and ligand binding determinants of the recombinant kringle 5 domain of human plasminogen. *Biochemistry* **37**: 3258-3271.
- Chhatwal G.S., Preissner K.T. (2000)** Extracellular matrix interactions with Gram-positive bacteria. In Gram-Positive Pathogens. Fischetti, V.A., et al. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp.78-86.
- Chhatwal G.S., Blobel H. (1985)** Binding of host plasma proteins to streptococci and their role in streptococcal pathogenicity. *IRCS Med. Sci.* **14**: 1-6.
- Childers N.K. (1989)** Molecular mechanisms of the immunoglobulin A defense. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 503-536.
- Christensen L. R., Castellino F. J., Sodetz J. M., Brockway W. J., Siefring G. E. (1996)** *Methods. Enzymol.* **45**: 244-257.

**Christensen U., Molgaard L. (1991)** Stopped-flow kinetic studies of glu-plasminogen. Conformational changes triggered by AH-site ligand binding. *FEBS Lett.* **278**: 204-206.

**Chu C.T., Pizzo S.V. (1994)** Alpha-2-macroglobulin, complement, and biologic defense: antigens, growth factors, microbial proteases, and receptor ligation. *Lab. Invest.* **71**: 792-812.

**Chudwin D.S., Artrip S.G., Korenblit A., Schiffman G., Rao S. (1985)** Correlation of serum opsonins with in vitro phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **50**: 213-217.

**Cockell C.S., Marshall J.M., Dawson K.M., Cederholm-Williams, S.A., Ponting C.P. (1998)** Evidence that the conformation of unliganded human plasminogen is maintained via an intramolecular interaction between the lysine-binding site of kringle 5 and the N-terminal peptide. *Biochem. J.* **333**: 99-105.

**Collen D., Verstraete M. (1975a)** Molecular biology of human plasminogen. II Metabolism in physiological and some pathological conditions in man. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **34**: 403.

**Cooper E.H. (1994)** Neuron-specific enolase. *Int. J. Biol. Markers* **9**: 205-210.

**Cox M., Schaller J., Boelens R., Kaptein R., Rickli E.E., Llinás M. (1994)** Kringle solution structures via NMR: two-dimensional H-NMR analysis of horse plasminogen kringle 4. *Chem. Phys. Lipids* **67/68**: 43-58.

**Crain M.J., Waltman W.D., Turner J.S., Yother J., Talkington D.F., McDaniel L.S., Gray B.M., Briles D.E. (1990)** Pneumococcal surface protein A (PspA) is serological highly variabel and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **58**: 3293-3299.

**Cundell D.R., Tuomanen E.I. (1994)** Receptor specifity of adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human type II pneumocytes and vascular endotelial cells in vitro. *Microb. Pathog.* **17**: 361-374.

**Cundell D.R., Gerard N.P., Gerard C., Idanpaan-Heikkila I., Tuomanen E.I. (1995)** *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* **377**: 435-438.

**Dagan R., Melamed R., Muallem M., Piglansky L., Yagupsky P. (1996)** Nasopharyngeal colonization in southern Israel with antibiotic-resistant pneumococci during the first 2 years of life: relation to serotypes likely to be included in pneumococcal conjugate vaccines. *J. Infect. Dis.* **174**: 1352-1355.

**Dagan R., Isaachson M., Lang R.R., Karpuch J., Block C., Amir J. for the israeli pediatric bacteriemia und meningitis group (1994)** Epidemiology of pediatric meningitis caused by Haemophilus influenzae type b *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* in Israel. *J. Infect. Dis.* **169**: 912- 916.

**Dagan R., Melamed R., Muallem M, Piglansky L., Yagupsky P. (1996)** Nasopharyngeal colonization in southern Israel with antibiotic-resistant pneumococci during the first 2 years of life:relation to serotypes likely to be included in pneumococcal conjugate vaccines. *J. Infect. Dis.* **174**: 1352-1355.

**De Munk G.A.W., Rijken D.C. (1990)** Fibrinolytic properties of single chain urokinase type plasminogen activator (pro-urokinase). *Fibrinolysis* **4**: 1-9.

**DePoli P., Bacon-Baguley T., Kendra-Franczak S., Cederholm M.T., Walz D.A. (1989)** Thrombospondin interaction with plasminogen. Evidence or binding to a specific region of the kringle structure of plasminogen. *Blood* **73**: 976-982.

**DeVos A.M., Ultsch M.H., Kelley R.F., Padmanabhan K., Tulinsky A., Westbrook M.L., Kossiakoff A.A. (1992)** Crystal structure of the kringle 2 domain of tissue plasminogen activator at 2.4 Å resolution. *Biochemistry* **31**: 270-279.

- Diaz E., Garcia E., Ascarso C., Mendez E., Lopez R., Garcia J.L. (1989)** Subcellular localization of the major pneumococcal autolysin: a peculiar mechanism of secretion in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**: 1238- 44.
- Dintilhac A., Alloing G., Granadel C., Claverys J.P. (1997)** Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol. Microbiol.* **25**: 727-739.
- Duchin J.S., Breiman R.F., Diamond A., Lipman H.B., Block S.L., Hedrick J.A., Finger R., Elliott J.A. (1995)** High prevalence of multi- drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* among children in a rural Kentucky community. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **14**: 745-750.
- Dudani A.K., Cummings C., Hashemi S., Ganz P.R. (1993)** Isolation of a novel 45 kDa plasminogen receptor from human endothelial cells. *Thromb. Res.* **69**: 185-196.
- Duensing T.D., van Putten J.P.M. (1997)** Vitronectin mediates internalization of *Neisseria gonorrhoeae* by chinese hamster ovary cells. *Infect. Immun.* **65**: 964-970.
- Duquerroy S., Camus C., Janin J. (1995)** X-ray structure and catalytic mechanism of lobster enolase. *Biochemistry* **34**: 12513-12523.
- Duval-Jobe C. und Parmely M. J. (1994)** Regulation of plasminogen activation by human U937 promonocytic cells. *J.Biol. Chem.* **269**: 21353-21357.
- Eberhard T., Kronvall G., Ullberg M. (1999)** Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. *Microb. Pathog.* **26**:175-181.
- Emini E.A., Hughes J.V., Perlow D.S., Boyer J. (1985)** Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by virus-specific synthetic peptide. *J. Virol.* **55**(3): 836-839.
- Faller L.D., Baroudy B.M., Johnson A.M., Ewall R.X. (1977)** Magnesium ion requirements for yeast enolase reactivity. *Biochemistry* **16**: 3864-3869.
- Felez J., Miles L.A., Fabregas P., Jardi M., Plow E.F., Lijnen R.H. (1996)** Characterization of cellular binding sites and interactive regions within reactants required for enhancement of plasminogen activation by tPA on the surface of leucocytic cells. *Thromb. Haemost.* **76**: 25684-25691.
- Ferrante A., Rowan-Kelly B., Paton J.C. (1984)** Inhibition of in vitro human lymphocyte response by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect. Immun.* **46**: 585-589.
- Fine D.P. (1975)** Pneumococcal type associated variability in alternate complement pathway activation. *Infect. Immun.* **12**: 772-778.
- Finlay B.B., Falkow S. (1997)** Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 136-169.
- Fischer B.E. (1992)** Comparison of fibrin-mediated stimulation of plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator (t-PA) and fibrin-dependent enhancement of amidolytic activity of t-PA. *Blood Coag. Fibrinol.* **3**: 197-204.
- Fischer H., Tomasz A. (1984)** Production and release of peptidoglycan and wall teichoic acid polymers in pneumococci treated with beta lactam antibiotic. *J. Bacteriol.* **157**(2): 507-513.
- Fischetti V.A., Pancholi V., Schneewind O. (1990)** Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from Gram-positive cocci. *Mol. Microbiol.* **4**: 1603-1605.
- Fox D., Smulia A.G. (2001)** Plasminogen-binding activity of enolase in the opportunistic pathogen *Pneumocystis carinii*. *Med. Mycol.* **39**: 495-507.
- Frank R. (1992)** Spot-Synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **48**: 9217-9232.

- Frank R. (1995)** Simultaneous and combinatorial chemical synthesis techniques for the generation and screening of molecular diversity. *J. Biotechnol.* **41**: 259-272.
- Freudl R. (1992)** Protein secretion in gram-positive bacteria. *J. Biotechnol.* **23(3)** 231-240.
- Fritz H., Wunderer G. (1983)** Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs. *Arzneim. Forschung* **33**: 479-483.
- Fuchs H., Wallich R., Simon M.M., Kramer M.D. (1994)** The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **91**: 12594-12598.
- Garcia-Leonie M.E., Cercenado E., Rodeno P., Bernaldo de Quiros J.C.L., Martinez-Hernandez D., Bouza E. (1992)** Susceptibility of *streptococcus pneumoniae* to penicillin: a prospective microbiological and clinical study. *J. Infect. Dis.* **14**: 427-435.
- Gase K., Gase A., Schirmer H., Malke H. (1996)** Cloning, sequencing and functional overexpression of the *Streptococcus equisimilis* H46A gapC gene encoding a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase that also functions as a plasmin(ogen)-binding protein. Purification and biochemical characterization of the protein. *Eur. J. Biochem.* **239**: 42-51.
- Geelen S., Bhattacharyya C., Tuomanen E. (1993)** The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. *Infect. Immun.* **61**: 1538-1543.
- Giebink G., Ripley-Petzoldt P., Juhn S., Aeppli D., Tomasz A., Tuomanen E. (1988)** Contribution of pneumococcal cell wall to experiment otitis media pathogenesis. *Ann. Otol. Rhinol Laryngol.* **132** (Suppl.): 28-30.
- Gold S., Moellering R.C. (1996)** Antimicrobial-drug resistance. *New Engl. J. Med.* **335**: 1445-1453.
- Gonzales-Gronow M., Stack S., Pizzo S. V. (1991)** Plasmin-binding to plasminogen receptor enhances catalytic efficiency and activates the receptor for subsequent ligand binding. *Arch. Biochem. Biophys.* **286**: 625-628.
- Gray B.M., Converse G.M., Dillon H.C. Jr. (1980)** Epidemiology studies of *streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 month of life. *J. Infect. Dis.* **142**: 923-933.
- Gray B.M., Converse G.M., Dillon H.C. Jr. (1979)** Serotypes of *streptococcus pneumoniae* causing diseases. *J. Infect. Dis.* **140**: 979-983.
- Grinnel, F. (1984)** Fibronectin and wound healing. *J. Cell. Biol.* **26**: 107-116.
- Grunstein M., Hogness D.S. (1975)** Colony hybridisation: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**: 3961-3965.
- Günzler W.A., Steffens G.J., Ötting F., Kim SMA, Frankus E, Flohé L. (1982)** The primary structure of high molecular mass urokinase from human urine. *Hoppe-Seyler's Z. Physio. Chem.* **363**: 115-1165.
- Guha-Chowdhury N., Clark A.G., Sisson C.H. (1997)** Inhibition of purified enolases from oral bacteria by fluoride. *Oral Microbiol. Immunol.* **12**: 91-97.
- Gulick A.M., Hubbard B.K., Gerlt J.A., Rayment I. (2000)** Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: crystallographic and mutagenesis studies of the reaction catalyzed by D-glutarate dehydratase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **39**: 4590-4602.
- Gurewich V., Pannel, R., Louie S., Kelly P., Suddith R.L. and Greenlee R. (1984)** Effective and fibrin-specific clot lysis by a zymogen precursor form of urokinase (prourokinase). *J. Clin. Invest.* **73**: 1731-1739.
- Hajjar K.A, Hamel N.M., Harpel P.C., Nuchman R.L. (1987)** Binding of tissue plasminogen activator to cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **80**: 1712-1719.

- Hammerschmidt S., Bethe G., Remane P.H., Chhatwal G.S. (1999)** Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **67**: 1683-1687.
- Hammerschmidt S., Talay S.R., Brandtzaeg P., Chhatwal, G.S. (1997)** SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory Immunoglobulin A and secretory component. *Mol. Microbiol.* **25 (6)**: 1113-1124.
- Han S., Stuart L.A., Friezner Degen S.J. (1991)** Characterization of the DNF15S2 locus on human chromosome 3: identification of a gene coding for four kringle domains with homology to hepatocyte growth factor. *Biochemistry* **30**: 9768-9780.
- Hanski E., Caparon M.G. (1992)** Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococci-*Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6172-6176.
- Håvarstein L.S., Coomaraswamy G., Morrison D.A. (1995)** An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11140-11144.
- Hay E.D. (1991)** Cell Biology of Extracellular Matrix. Plenum Press, New York.
- Higgins D.L., Bennett W.F. (1990)** Tissue plasminogen activator: the biochemistry and pharmacology of variants produced by mutagenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**: 91-121.
- Highsmith R.F., Kline D.L. (1971)** Kidney: Primary source of plasminogen after acute depletion in the cat. *Science* **174**: 141.
- Hjemeland L.M. (1990)** Solubilization of native membrane proteins. *Methods in Enzymology* **182**: 253-264.
- Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R. (1989)** Site-directed mutagenesis by overlap extension using polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59.
- Holtje J.V., Tomasz A. (1975)** Purification of the pneumococcal N-Acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. *J. Biol. Chem.* **251**: 4199- 4207.
- Holmes A.R., McNab R., Millsap K.W., Rohde M., Hammerschmidt S., Mawdsley J., Jenkinson H.F. (2001)** The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol. Microbiol.* **41(6)**: 1395-1408.
- Holvoet P., Lijnen H.R., Collen D. (1985)** A monoclonal antibody specific for Lys-plasminogen: application to the study of the activation pathways of plasminogen in vivo. *J. Biol. Chem.* **260**: 12106-12111.
- Hoskins J., Alborn W.E., Arnold J., Blaszczyk L.C., Burgett S., DeHoff B., Estrem S.T., Fritz L., Fu D.-J., Fuller W., Geringer C., Gilmour R., Glass J.S., Khoja H., Kraft A.R., Lagace R.E., LeBlanc D.J., Lee L.N., Lefkowitz E.J., Lu J., Matsushima P., McAhren S.M., McHenney M., McLeaster K., Mundy C.W., Nicas T.I., Norris F.H., O'Gara M., Peerly R.B., Robertson G.T., Rockey P., Sun P.-M., Winkler M.E., Yang Y., Young-Bellido M., Zhao G., Zook C.A., Baltz R.H., Jaskunas R., Rosteck P.R., Skatrud P.L., Glass J.I. (2001)** Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* **183**: 5709-5717.
- Hostetter M.K. (1986)** Serotypic variation among virulent pneumococci in disposition and degradation of covalently bound C3b: implications for phagocytosis and antibody production. *J. Infect. Dis.* **153**: 682-693.
- Houldsworth S., Andrew P.W., Mitchell T.J. (1994)** Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin- $1\beta$  by human mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.* **62**: 1501-1503.

- Hoylaerts M., Rijken D.C., Lijnen H.R., Collen D. (1982)** Kinetics of the activation of plasminogen by tissue-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* **257**: 2912-2919.
- Hu L.T., Pratt S.D., Perides G., Katz L., Rogers R.A., Klemper M.S. (1997)** Isolation, cloning, and expression of a 70-kilodalton plasminogen binding protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **65**: 4989-4995.
- Hu P., Elliot J., McCready P., Skowronski E., Garnes J., Kobayashi A., Brubaker R.R., Garcia E. (1998)** Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* **180**: 5192-5202.
- Hunter W.M., Greenwood F.C. (1962)** Preparation of iodine 131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* **194**: 495-496.
- Humphrey J.H. (1948)** Hyaluronidase production by pneumococci. *J. Pathol. Bacterio.* **55**: 273-275.
- Ito K., Ishiguro A., Kanbe T., Tanaka K., Torii S. (1995)** Characterization of IgE-binding epitopes on *Candida albicans* enolase. *Clin. Exp. Allergy* **25**: 529-535.
- Jackson R.L., Busch S.J., Cardin A.D. (1991)** Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol. Rev.* **71**: 481-539.
- Janin J., Wodak S. (1978)** Conformation of amino acid side chains in proteins. *J. Mol. Biol.* **125**: 357-386.
- Joh H.J., House-Pompeo K., Patti K., Gurusidappa S., Höök M. (1994)** Fibronectin receptors from gram-positive bacteria: comparison of active sites. *Biochemistry* **33(29)**: 6086-6092.
- Johnson M.K. (1977)** Cellular localisation of pneumolysin. *FEMS Microbiol. Let.* **2**: 243-245.
- Johnson L.B., Poulsen K., Kilian M., Petersen T.E. (1999)** Purification and cloning of a streptokinase from *Streptococcus uberis*. *Infect. Immun.* **67**: 1072-1078.
- Johnston R.B., Jr. (1991)** Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Rev. Infect. Dis.* **13**: 509-517.
- Kaiser E., Kuzmits R., Pregant P., Burghuber O., Worofka W. (1989)** Clinical biochemistry of neuronal specific enolase. *Clin. Chim. Acta* **183**: 13-31.
- Kato K., Asai R., Shimizu A., Suzuki F., Ariyoshi Y. (1983)** Immunoassay of three enolase isoenzymes in human serum and in blood cells. *Clin. Chim. Acta* **127**: 353-363.
- Kaufmann M., Bartholmes P. (1992)** Purification, characterization and inhibition by fluoride of enolase from *Streptococcus mutans* DSM 320523. *Caries Res.* **26**: 110-116.
- Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M. (1997)** Medizinische Mikrobiologie, 9. Aufl., Thieme Verlag.
- Kelly R.T., Farmer S., Greiff D. (1967)** Neuraminidase activity of clinical isolates of *Diplococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* **94**: 272-273.
- Kelly R., Greiff D. (1970)** Toxicity of pneumococcal neuraminidase. *Infection and Immunity* **2**: 115-117.
- Kievits F., Kijlstra A. (1985)** Inhibition of C3 deposition on solid phase bound immune complexes by lactoferrin. *Immunology* **54 (3)**: 449-456.
- Kijlstra A., Jeurissen S.H. (1982)** Modulation of classical C3 convertase of complement by tear lactoferrin. *Immunology* **47(2)**: 263-270.
- Kim J.O., Weiser J.N. (1998)** Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **177**: 368-377.

- Klein D.L. (1999)** Pneumococcal Disease and the role of conjugate vaccines. *Microb. Drug Resist.* **5** (2): 147-157.
- Kreis T., Vale R. (1993)** Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins. Oxford University Press, Oxford.
- Kukkonen M., Saarela S., Latteenmaki K., Hynonen U., Westerlund-Wikstrom B., Rhen M., Korhonen T.K. (1998)** Identification of two laminin-binding fimbriae, the type 1 fimbria of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and the G fimbria of *Escherichia coli*, as plasminogen receptors. *Infect. Immun.* **66**: 4965-4970.
- Kuusela P., Saksela O. (1990)** Binding and Activation of plasminogen at the surface of *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Biochem.* **193**: 759-765.
- Kuusela P., Ullberg M., Saksela O., Kronvall G. (1992)** Tissue-type plasminogen activator-mediated activation of plasminogen on the surface of group A, C and G streptococci. *Infect. Immun.* **60**: 196-201.
- Lahteemaki K., Kukkonen M., Korhonen T.K. (2001)** The Pla surface protease/adhesion of *Yersinia pestis* mediates bacterial invasion into human endothelial cells. *FEBS Lett.* **504**(1-2): 69-72.
- Lancefield R.C. (1928)** The antigenic complex of *streptococcus haemolyticus*. A Demonstration of a type specific substance in extracts of *streptococcus haemolyticus*. *J. Exp. Med.* **47**: 91-103.
- Lancefield R.C. (1933)** A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* **57**: 571-595.
- Lebioda L., Stec B. (1991)** Mechanism of enolase: the crystal structure of enolase. Mg<sup>2+</sup>(+)-phosphoglycerate/ phosphoenolpyruvate complex at 2.2-Å resolution. *Biochemistry* **30**: 2817-2822.
- Lebioda L., Stec B., Brewer J. M. (1989)** The structure of yeast enolase at 2.25-Å resolution. An 8-fold  $\beta + \alpha$ -barrel with a novel  $\beta\beta\alpha\alpha$  ( $\beta\alpha$ )<sub>6</sub> topology. *J. Biol. Chem.* **264**: 3685-3693.
- Lebioda L., Stec B. (1988)** Crystal structure of enolase indicates that enolase and pyruvate kinase evolved from a common ancestor. *Nature* **333**: 683-686.
- Lebioda L., Brewer J.M. (1984)** Crystallization and preliminary crystallographic data for a tetragonal form of yeast enolase. *J. Mol. Biol.* **180**: 213-215.
- Leggiadro R.J., Barrett F.F., Chesney P.J., Davis Y., Tenover F.C. (1994)** Invasive pneumococci with high level penicillin resistance at a children's hospital. *Pediatr. Infect. Dis.J.* **13**: 320-322.
- Li X., Bokman A.M., Llinás M., Smith R.A.G., Dobson C.M. (1994)** Solution structure of the kringle domain from urokinase-type plasminogen activator. *J. Mol. Biol.* **235**: 1548-1559.
- Lijnen H.R., Hoylaerts M., Collen D. (1980)** Isolation and Characterization of a human plasma protein with affinity for the lysine binding sites in plasminogen. *J. Biol. Chem.* **255**: 10214-10222.
- Lock R.A., Paton J.C., Hansman D. (1988)** Comparative efficacy of pneumococcal neuraminidase and pneumolysin as immunogens protective against *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Pathog.* **5**: 461-467.
- Lohman K., Meyerhof O. (1934)** Über die enzymatische Umwandlung von Phosphoglyzerinsäure in Brenztraubensäure und Phosphorsäure (Enzymatic transformation of phosphoglyceric acid into pyruvic and phosphoric acid). *Biochem. Z.* **273**: 60-72.
- Lomholt H. (1995)** Evidence of recombination and an antigenically diverse immunoglobulin A1 protease among strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **63**: 4238-4243.
- Lottenberg R., Minning-Wenz D., Boyle M. D. (1994)** Capturing host plasmin(ogen) a common mechanism for invasive pathogens? *Trends Microbiol.* **2**: 20-24.

- Lottenberg R., DesJardin L.E., Wang H., Boyle M.D. (1992)** Streptokinase-producing streptococci grown in human plasma acquire unregulated cell-associated plasmin activity. *J. Infect. Dis.* **166**(2): 436-40.
- Lottenberg R., Broder C.C., Boyle M.D.P., Kain S.J., Schroeder B.L., Curtiss R. (1992a)** Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of a streptococcal plasmin receptor. *J. Bacteriol.* **174**: 5204-5210.
- Loskutoff D.J. (1991)** Regulation of PAI-1 gene expression. *Fibrinolysis* **5**: 197-206.
- Lucas M.A., Fretto L.A., McKee P.A. (1983)** The binding of human plasminogen to fibrin and fibrinogen. *J. Biol. Chem.* **258**: 4249-4256.
- Lund E., Henrichsen J. (1987)** Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. In: Bergan T., Norris J.R., eds. *Methods in microbiology*. Vol. 12 New York: Academic Press; 241-261.
- Magnusson S., Petersen T.E., Sottrup-Jensen L., Claeys H. (1975)** Complete primary structure of prothrombin: isolation, structure and reactivity of ten carboxylated glutamic acid residues and regulation of prothrombin activation by thrombin. In: Reich E., Rifkin D.B. Shaw E. eds. *Proteases and Biological Control*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratories; 123-149.
- Male C.J. (1979)** Immunoglobulin A1 protease production by *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **26**: 254-261.
- Malstrom B.G. (1961)** Enolase. In: *The Enzymes*, pp.471-494, Boyer P.D., Lardy H. and Myrback K. (eds.), Academic Press, New York.
- Marangos P.J., Zis A.P., Clark R.L., Goodwin F.K. (1978)** Neuronal, non-neuronal and hybrid forms of enolase in brain: structural, immunological and functional comparisons. *Brain Res.* **150**: 117-133.
- Markus G., Priore R.I., Wissler F.C. (1979)** The binding of transhexamic acid to native (Glu) and modified (Lys) human plasminogen and its effect on conformation. *J. Biol. Chem.* **254**: 1211-1216.
- Markus G., DePasquale J.L., Wissler F.C. (1978)** Quantitative determination of the binding of epsilon amino-caproic acid to native plasminogen. *J. Biol. Chem.* **253**: 727-732.
- Marshall J.M., Brown A.J., Ponting C.P. (1994)** Conformational studies of human plasminogen and plasminogen fragments: evidence for a novel third conformation of plasminogen. *Biochemistry* **33**: 3599-3606.
- Mathews I.I., Vanderhoff-Hanaver P., Castellino F.J., Tulinsky A. (1996)** Crystal structures of the recombinant kringle 1 domain of human plasminogen in complexes with the ligand  $\epsilon$ -aminocaproic acid and trans-4-amino(methyl)cyclohexane-1-carboxylic acid. *Biochemistry* **35**: 2567-2576.
- Matsuka Y.V., Novokhatny V.V., Kudinov S.A. (1990)** Fluorescence spectroscopic analysis of ligand binding to kringle 1+2+3 and kringle 1 fragments from human plasminogen. *Eur. J. Biochem.* **190**: 93-97.
- Matsuo O., Okada K., Fukao H., Tomioka Y., Ueshima S., Watanuki M., Sakai M. (1990)** Thrombolytic properties of staphylokinase. *Blood* **76**(5): 925-929.
- Matsuo K., Yamaguchi R., Yamazaki A., Tasaka H., Yamada T. (1988)** Cloning and expression of the mycobacterium bovis BCG gene for the extracellular alpha antigen. *J. Bacteriol.* **170**: 3847-3854.
- Mattsby-Baltzer I., Roseanu A., Motas C., Elverfors J., Engberg I., Hanson L.A. (1996)** Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pediatr. Res.* **40**(2): 257-262.
- Maturen A.J., Barnhart M.I. (1975)** Cell loci and plasminogen antigen (abstr.) 23d Wayne State Symposium on Blood, Detroit.



- Mbelle N., Huebner R.E., Wasas A.D., Kimura A., Chang I., Klugman K.P. (1999)** Immunogenicity and impact on nasopharyngeal carriage of nonvalent pneumococcal conjugate vaccine. *J. Infect. Dis.* **180**: 1171-1176.
- McAlister L., Holland M.J. (1982)** Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. Identification and isolation of yeast enolase isoenzymes. *J. Biol. Chem.* **257**: 78181-7188.
- McCance S.G., Castellino F.J. (1995)** Contributions of the individual kringle domains toward maintenance of the chloride-induced tight conformation of human glutamic acid-1 plasminogen. *Biochemistry* **34**: 9581-9586.
- McDaniel L.S., Ralph B.A., McDaniel D.O., Briles D.E. (1994)** Localization of protection-eliciting epitopes on PspA of *Streptococcus pneumoniae* between amino acid residues 192-260. *Microb. Pathog.* **17**(5): 323-337.
- McDaniel L.S., Sheffield J.S., Delucchi P., Briles D.E. (1991)** PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infect. Immun.* **59**: 222-228.
- McLean J.W., Tomlinson J.E., Kuang W.J., Eaton D.L., Chen E.Y., Fless G.M., Scanu A.M., Lawn R.M. (1987)** cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. *Nature* **330**: 132-137.
- McMullen B.A., Fujikawa K. (1985)** Amino acid sequence of the heavy chain of human  $\alpha$ -factor XIIIa (activated Hageman factor). *J. Biol. Chem.* **260**: 5328-5340.
- Menhart N., Sehl L.C., Kelley R.F., Castellino F.J. (1991)** Construction, Expression, and Purification of Recombinant Kringle 1 of Human Plasminogen and Analysis of Its Interaction with  $\omega$ -Amino Acids. *Biochemistry* **30**: 1948-1957.
- Merkulova T., Lucas M., Lamande N., Rouzeau J.-D., Gros F., Lazar M., Keller A. (1997)** Biochemical characterization of the mouse muscle-specific enolase: development changes in electrophoretic variants and selective binding to other proteins. *Biochem. J.* **323**: 791-800.
- Mikol V., LoGrasso P.V., Boettcher B.R. (1996)** Crystal structures of apolipoprotein(a) kringle IV37 free and complexed with 6-aminohexanoic acid and with *p*-aminomethylbenzoic acid. *J. Mol. Biol.* **256**: 751-761.
- Miles L.A., Dahlberg C.M., Plescia J., Felez J., Kato K., Plow E.F. (1991)** Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolases as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* **30**: 1682-1691.
- Miles L.A., Flez J., Dahlberg C.M., Plow E.F. (1990)** A Candidate cell-surface plasminogen binding protein. *Fibrinolysis* **4** (Suppl 3) 162.
- Miles L.A., Dahlberg C.M., Plow E.F. (1988)** The cell binding domains of plasminogen and their function in plasma. *J. Biol. Chem.* **263**: 11928-11934.
- Miles L.A., Plow E.F. (1987)** Receptor mediated binding of the fibrinolytic components, plasminogen and urokinase, to peripheral blood cells. *Thromb. Haemost.* **58**: 936-942.
- Miles L.A., Plow E.F. (1985)** Binding and activation of plasminogen on the platelet surface. *J. Biol. Chem.* **260**: 4304-4311.
- Miyashita C., Wenzel E., Heiden M. (1988)** Plasminogen: A brief introduction into its Biochemistry and Function. *Haemostasis* **18**: suppl.1 7-13.
- Morrison D.A., Trombe M.-C., Hayden M.K., Waszak G.A., Chen J.-D. (1984)** Isolation of transformation-deficient *Streptococcus pneumoniae* mutants defective in control of competence, using

insertion-duplication mutagenesis with the erythromycin resistance determinant of pAM $\beta$ 1. *J. Bacteriol.* **159**: 870-876.

**Mosher D.F., Proctor R.A. (1980)** Binding of factor XIIIa-mediated cross-linking of a 27-kilodalton fragment of fibronectin to *Staphylococcus aureus*. *Science* **209**: 927-929.

**Mosesson M.W. (1990)** Fibrin polymerization and its regulatory role in hemostasis. *J. Lab. Clin. Med.* **116**: 8-17.

**Mufson M.A.: Streptococcus pneumoniae in: Mandell G. L., Douglas R.G., Bennet J.E. (1990) (Eds.) Principles and practice of infectious diseases. p.1539, New York, Edinburgh, London, Melbourne.**

**Mulichak A.M., Tulinsky A., Ravichandran K.G. (1991)** Crystal structure of human plasminogen kringle 4 refined at 1,9-Å resolution. *Biochemistry* **30**: 10576-10588.

**Murray P.R., Drew W.C., Kobayashi G.S., Thompson J.H. (1990)** Medical Microbiology International Student Edition, Wolfe Education Ltd.

**Musher D.M. (1992)** Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity and treatment. *Clin. Infect. Dis.* **14**: 801-809.

**Nakajima K., Hamanoue M., Takemoto N., Hattori T., Kato K., Kohsaka S. (1994)** Plasminogen binds specifically to a alpha-enolase on rat neuronal plasma membrane. *J. Neurochem.* **63**: 2048-2057.

**Nakamura T., Nishizawa T., Hagiya M. (1989)** Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **342**: 440-443.

**Navarre W.W., Schneewind O. (1999)** Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63** (1):174-229.

**Neu H.C. (1992)** The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**: 1064-1073.

**Neufeld, F. (1902)** Über die Agglutination der Pneumokokken und über die Theorie der Agglutination. *Z. Hyg. Infektionskr.* **40**: 54-72.

**Nice E.C., Mc Inerny T.L., Jackson D.C. (1996)** Analysis of the Interaction between the synthetic peptide of influenza virus hemagglutinin and monoclonal antibody using an optical biosensor. *Mol. Immunol.* **33**: 659-670.

**Nielsen S.V. und Henrichsen J. (1992)** Capsular types of *Streptococcus pneumoniae* isolated from blood and CSF during 1982-1987. *Clin. Infect. Dis.* **15**: 794-798.

**Niklinski J., Furman M. (1995)** Clinical tumor markers in lung cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* **4**: 129-138.

**Novak R., Henriques B., Charpentier E., Normak S., Tuomanen E. (1999)** Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* **399**: 590-593.

**Novak R., Braun J.S., Charpentier E., Tuomanen E. (1998)** Penicillin tolerance genes of *Streptococcus pneumoniae*: the ABC-type manganese permease complex Psa. *Mol. Microbiol.* **29**: 1285-1296.

**Novokhatny V.V., Matsuka Y.V., Kudinov S.A. (1989)** Analysis of ligand binding to kringles 4 and 5 fragments from human plasminogen. *Thromb. Res.* **53**: 243-252.

**O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H., Folkman J. (1994)** Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79**: 315-328.

- Pancholi V. (2001)** Review: Multifunctional  $\alpha$ -enolase: its role in diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 902-920.
- Pancholi V., Fischetti V. A. (1998)**  $\alpha$ -Enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J. Biol. Chem.* **273**: 14503-14515.
- Pancholi V., Fischetti V.A. (1997)** Identification of a glycolytic enzyme complex on the surface of group A streptococci. 97th ASM General Meeting, Miami Beach FL, paper B-42.
- Pancholi V., Fischetti V.A. (1992)** A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyd-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J. Exp. Med.* **176**: 415-426.
- Parkkinen J., Hacker J., Korhonen T.K. (1991)** Enhancement of tissue plasminogen activator-catalyzed plasminogen activation by *Escherichia coli* S fimbriae associated with neonatal septicaemia and meningitis. *Thromb. Haemost.* **65**: 483-486.
- Parkkinen J., Korhonen T. K. (1989)** Binding of plasminogen to *Escherichia coli* adhesion proteins. *FEBS Lett.* **250**: 437-440.
- Paton J.C. (1996)** The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of *streptococcus pneumoniae*. *Trends Microbiol.* **4**: 103-106.
- Paton J.C., Andrew P.W., Boulnois G.J., Mitchell T.J. (1993)** Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 89-115.
- Paton J.C., Berry A.M., Lock R.A. (1983)** Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **40**: 548-552.
- Paton J.C., Ferrante A. (1983)** Inhibition of human polymorphnuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. *Infect. Immun.* **41**: 1212-1216.
- Patti J.M., Allen B.L., McGavin M.J., Höök M. (1994)** MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues p.585-617 in L.N.Ornston, A.Balows, and E. P. Greenberg (ed.) Annual reviews of microbiology, Annual Rev. Inc., Palo Alto Calif.
- Pawluk A., Scopes R.K., Griffiths-Smith K. (1986)** Isolation and properties of the glycolytic enzymes from *Zymomonas mobilis*. The five enzymes from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase through to pyruvate kinase. *Biochem. J.* **238**(1): 275-81.
- Peltz S.W., Hardt T.A., Mangel W.F. (1982)** Positive regulation of plasminogen by urokinase: differences in the  $K_m$  for (glutamic acid) plasminogen and lysine-plasminogen and effect of certain  $\alpha, \omega$ -amino acids. *Biochemistry* **21**: 2798-2804.
- Pennica D., Holmes W.E., Kohr W.J., Hrakins R.N., Vehar G.A., Ward C.A., Bennett W.F., Yelverton E., Seeburg P.H., Heyneker H.L., Goeddel D.L., Collen D. (1983)** Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* **301**: 214-221.
- Perides G., Noring R., Klempner M.S. (1996)** Inhibition of *Borrelia burgdorferi*-bound fibrinolytic enzymes by  $\alpha$ -2-antiplasmin, PAI-1 and PAI-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**: 690-695.
- Pernod G., Aouffen M., Polack B., LeMagueresse B., Benabid A.L., Kolodie L. (1998)** tPA-dependent activation of C6 glioma-bound plasminogen: a kinetic study. *Fibrinol. Proteol.* **12**: 137-144.
- Plow E.F., Herren T., Redlitz A., Miles L.A., Hoover-Plow J.L. (1995)** The cell biology of the plasminogen system. *FASEB J.* **9**: 939-945.
- Plow E.F., Felez J., Miles L.A. (1991)** Cellular regulation of fibrinolysis. *Thromb. Haemostasis* **66**: 32-36.

- Plow E.F., Miles L.A. (1990)** Plasminogen receptors in the mediation of pericellular proteolysis. *Cell. Differ. Dev.* **32**(3): 293-298.
- Plow E.F., Freany D.E., Plescia J., Miles L.A. (1986)** The plasminogen system and cell surfaces: evidence for plasminogen and urokinase receptors on the same cell type. *J. Cell. Biol.* **103**: 2411-2420.
- Poland G.A. (1999)** The burden of pneumococcal disease: the role of conjugated vaccines. *Vaccine* **26**: 1674-1679.
- Pollanen J., Stephens R. W., Vaheri A. (1991)** Directed plasminogen activation at the surface of normal and malignant cells. *Adv. Cancer Res.* **57**: 273-328.
- Ponting C.P., Marshall J.M., Cederholm-Williams S.A. (1992)** Plasminogen: a structural review. *Blood Coagul. Fibrinol.* **3**: 605-614.
- Ponting C.P., Holland S.K., Cederholm-Williams S.A., Marshall J.M., Brown A.J., Spraggon G. und Blake C.C.F. (1992)** The compact domain conformation of human glu-plasminogen in solution. *Biochem. Biophys. Acta* **1159**: 155-161.
- Poulsen K., Reinhold J., Kilian M. (1996)** Characterization of the *S. pneumoniae* Immunoglobulin A1 protease gene (iga) and its translation product. *Infect. Immun.* **64** (10): 3957-3966.
- Preissner K.T., Chhatwal G.S. (1999)** Extracellular matrix (ECM) and host cell surfaces: Potential sites of pathogen interaction. In: Cellular microbiology, ed. P. Cossar et al., ASM Press, Washington DC, pp.49-65.
- Rabiner S.F., Goldfine I.D., Hart A., Summaria L., Robbins K.C. (1969)** Radioimmunoassay of human plasminogen and plasmin. *J. Lab. Clin. Med.* **74**: 265.
- Ranby M. (1982)** Studies in the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator. *Biochem. Biophys. Acta* **704**: 461-469.
- Ranson M., Andronicos N.M., O'Mullane M.J., Baker M.S. (1998)** Increased plasminogen binding is associated with metastatic breast cancer cells: differential expression of plasminogen binding proteins. *Br. J. Cancer* **77**: 1586-1597.
- Rattner J.B., Martin L., Waisman D.M., Johnstone S.A., Fritzler M.J. (1991)** Autoantibodies to the centrosome (centriole) react with determinants present in the glycolytic enzyme enolase. *J. Immunol.* **146**: 2341-2344.
- Redlitz A., Fowler B.J., Plow E.F., Miles L.A. (1995)** The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. *Eur. J. Biochem.* **227**: 407-415.
- Rejante M.R., Llinás M. (1994)** Solution of the  $\epsilon$ -aminohexanoic acid complex of human plasminogen kringle 1. *Eur. J. Biochem.* **221**: 939-949.
- Rennels M.B., Edwards K.M., Keyserling H.L., Reisinger K.S., Hogerman D.A., Madore D.V., Chang I., Paradiso P.R., Malinoski F.J., Kimura A. (1998)** Safety and Immunogenicity of heptavalent pneumococcal Vaccine conjugated to CRM<sub>197</sub> in United States infants. *Pediatrics* **101**: 604-611.
- Riesenfeld-Orn J., Wolpe S., Garcia-Bustos J.F., Hoffmann M.K., Tuomanen E. (1989)** Production of interleukin-1 but not tumor necrosis factor by human monocytes stimulated with pneumococcal cell surface components. *Infect. Immun.* **57**: 1890-1893.
- Rimini R., Jansson B., Feger G., Roberts T.C., deFrancesco M., Gozzi A., Faggioni F., Domenici E., Wallace D.M., Frandsen N., Polissi A. (2000)** Global analysis of transcription kinetics during competence development in *Streptococcus pneumoniae* using high density DNA arrays. *Mol. Microbiol.* **36**(6): 1279-1292.

- Rosenow C., Ryan P., Weiser J.N., Johnson S., Fontan P., Ortqvist A., Masure H.R. (1997) Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **25**: 819-829.
- Rosey E.L., Lincoln R.A., Ward P.N., Yancey R.J.Jr., Leigh J.A. (1999) PauA: a novel plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **178**: 27-33.
- Rouy D., Anglés-Cano E. (1990) The mechanism of activation of plasminogen at the fibrin surface by tissue-type plasminogen activator in a plasma milieu in vitro: role of  $\alpha_2$ -antiplasmin. *Biochem. J.* **271**: 51-57.
- Royds J.A., Parsons M.A., Taylor C.B., Timperley W.R. (1982) Enolase isoenzyme distribution in the human brain and its tumors. *J. Pathol.* **137**: 37-49.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 481-491.
- Saksela O., Rifkin D. B. (1988) Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **4**: 93-126.
- Sako T., Tsuchida N. (1983) Nucleotide sequence of the staphylokinase gene from *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* **11**: 7679-7693.
- Salyers A.A., Whitt D.D. (1994) Bacterial pathogenesis: a molecular approach, ASM Press, Washington D.C.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y.
- Sampson J.S., O'Connor S.P., Stinson A.R., Tharpe J.A., Russel H. (1994) Cloning and nukleotide sequence analysis of psaA, the *S. pneumoniae* gene encoding a 37-kDa protein homologous to previously reported Streptococcus sp. Adhesins. *Infect. Immun.* **62**: 319-324.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467
- Sankilampi U., Herva E., Haikala R., Liimatainen O., Renkonen V., Leinonen M. (1997) Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in adults in Finland. *Epidemiol. Infect.* **118**: 7-15.
- Sargent F., Berks B.C., Palmer T. (2002) Assembly of membrane-bound respiratory complexes by the Tat protein-transport system. *Arch. Microbiol.* **178**(2): 77-84.
- Schaerlaekens K., Schierova M., Lammertyn E., Geukens N., Anne J., Van Mellart L. (2001) Twin-arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **183** (23): 6727-6732.
- Schiffman G. (1983) Pneumococcal vaccine: a tool for the evaluation of the B-cell function of the immun system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **174**: 309-315.
- Schlegel H.G. (1992) Allgemeine Mikrobiologie, 7. Aufl.; Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Schneewind O., Model P., Fischetti V.A. (1992) Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. *Cell* **70**: 267-281.
- Scott J.A., Hall A.J., Dagan R., Dixon M., Eykyn S.J., Fenoll A., Hortal M., Jette L.P., Jorgensen J.H., Lamothe F., Latorre C., Macfarlane J.T., Shlaes D.M., Smart L.E., Taunay A. (1996) Serogroup-specific epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*: association with age, sex, and geography in 7,000 episodes of invasive disease. *Clin. Infect. Dis.* **27**: 973-981.
- Seshadri T.P., Tulinsky A., Skrzypczak-Jankum E., Park C.H. (1991) Structure of bovine prothrombin fragment 1 refined at 2.25 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **220**: 481-494.

- Shapiro E.D., Berg A.T., Austrian R., Schroeder D., Parcels V., Margolis A., Adair R.K., Clemens J.D. (1991)** The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. *N. Engl. J. Med.* **325**: 1453-1460.
- Singh R.P., Setlow P., Setlow B. (1977)** Levels of small molecules and enzymes in the mother cell compartment and the forespore of sporulating *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* **130(3)**: 1130-1138.
- Sjöbring U., Pohl G., Olsén A. (1994)** Plasminogen, absorbed by *Escherichia coli* expressing curli or by *Salmonella enteritidis* expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (t-PA). *Mol. Microbiol.* **14**: 443-452.
- Sjostrom I., Grondahl H., Falk G., Kronvall G., Ullberg M. (1997)** Purification and characterisation of a plasminogen-binding protein from *Haemophilus influenzae*. Sequence determination reveals identity with aspartase. *Biochem. Biophys. Acta* **1324**: 182-190.
- Sorensen U.B., Henrichsen J. (1987)** Cross-reaction between pneumococci and other streptococci due to C polysaccharide and F-antigen. *J. Clin. Microbiol.* **25 (10)**: 1854-1859.
- Sorensen U.B.S., Agger R., Bennedsen J., Henrichsen J. (1984)** Phosphorylcholine determinants in six pneumococcal capsular polysaccharides detected by monoclonal antibody. *Infect. Immun.* **43**: 876-878.
- Southern E.M. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Spring T.G., Wold F. (1971)** Studies on two high-affinity enolase inhibitors. Reaction with enolases. *Biochemistry* **10(25)**: 4655-4660.
- Stellwagen E., Cronlund M.M., Barnes L.D. (1973)** A thermostable enolase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus* YT-1. *Biochemistry* **12(8)**: 1552-1559.
- Talay S.R., Ehrenfeld E., Chhatwal G.S., Timmis K.N. (1991)** Expression of the fibronectin-binding components of *Streptococcus pyogenes* in *Escherichia coli* demonstrates that they are proteins. *Mol. Microbiol.* **5**: 1727-1734.
- Talay S.R., Zock A., Rohde M., Molinari G., Oggioni M., Pozzi G., Guzman C.A., Chhatwal G.S. (2000)** Co-operative binding of human fibronectin to sfbl protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **2(6)**: 251-535.
- Talkington D.F., Brown B.G., Tharpe J.A., Koenig A. und Russell H. (1996)** Protection of mice against fetal pneumococcal challenge by immunization with pneumococcal surface adhesin (PsaA). *Microb. Pathog.* **21**: 17-22.
- Tewodros W., Norgren M., Kronvall G. (1995)** Streptokinase activity among group A streptococci in relation to streptokinase genotype, plasminogen binding, and disease manifestations. *Microb. Pathog.* **18(1)**: 53-65.
- Tillet W.S., Garner R.L. (1933)** *J. Exp. Med.* **58**: 485-502.
- Tomasi T.B., Tan E.M., Solomon A., Prendergast R.A. (1965)** Characteristics of an immune system common to certain external secretion. *J. Exp. Med.* **121**: 101-121.
- Tomasz A., Munoz R. (1995)** Beta-Lactam antibiotic resistance in gram-positive bacterial pathogens of the upper respiratory tract: a brief overview of mechanisms. *Microb. Drug Resist.* **1(2)**: 103-109.
- Tomlinson S. (1993)** Complement Defense Mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* **5**: 83-89.
- Towbin H., Staehlin T., Gordon J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- Tranqui L., Prandini M., Chapel A. (1979)** The structure of plasminogen studied by electron microscopy. *Biol. Cellulaire* **34**: 39-42.

- Tulinsky A. (1991)** The structure of domains of blood proteins. *Thromb. Haemost.* **66**: 16-31.
- Tuomanen E.I., Masure H.R. (1997)** Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Microb. Drug Resist.* **3(4)**: 297-308.
- Tuomanen E.I., Austrian M.D., Masure H.R. (1995)** Pathogenesis of Pneumococcal infection. *The New England Journal of Medicine* **332 (19)**:1280-84.
- Ullberg M., Kronvall G., Karlsson I., Wiman B. (1990)** Receptors for human plasminogen on gram negative bacteria. *Infect. Immun.* **58**: 21-25.
- Ullberg M., Kronvall G., Wiman B. (1989)** New receptor for human plasminogen on gram positive cocci. *APMIS* **97**: 996-1002.
- Ullberg M., Kuusela P., Kristiansen B.-E., Wiman B. (1992)** Binding of plasminogen to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* and formation of surface-associated plasmin. *J. Infect. Dis.* **166**: 1329-1334.
- Underdown B.J., Schiff J.M. (1986)** Immunoglobulin A: Strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu. Rev. Immunol.* **4**: 389-417.
- Van Dam J.E., Fleer G.A., Snippe H. (1990)** Immunogenicity of *streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. *Antonie van Leeuwenhoek* **58**: 1-47.
- Veerhuis R., Kijlstra A. (1982)** Inhibition of hemolytic complement activity by lactoferrin in tears. *Exp. Eye Res.* **34(2)**: 257-265.
- Von Heijne G., Blomberg C. (1979)** Transmembrane translocation of proteins. *Eur. J. Biochem.* **87**: 175-181.
- Ward P.N., Leigh J.A. (2002)** Characterization of PauB, a novel broad-spectrum plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. *J. Bacteriol.* **184**: 119-25.
- Watson D.A., Musher D.M. (1990)** Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by inserting of transposon Tn916. *Infect. Immun.* **58**: 3135-3138.
- Weidong-Richard J.I., Castellino F.J., Chang Y., Deford M.E., Gray H., Villareal X., Kondri M.E., Marti D. N., Llinás M., Schaller J., Kramer R.A., Trail P. (1998)** Characterization of kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *FASEB* **12**: 1731-1738.
- Weiser J.N., Austrian R., Sreenivasan P.K., Masure H.R. (1994)** Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**: 2240-2245.
- Widdowson C.A., Klugmann K.P. (1999)** Molecular mechanisms of resistance to commonly used non-betalactam drugs in *Streptococcus pneumoniae*. *Semin. Respir. Infect.* **14**: 255-268.
- Wistedt A.C., Kotarsky H., Marti D., Ringdahl U., Castellino F.J., Schaller J., Sjöbring U. (1998)** Kringle 2 mediates high affinity binding of plasminogen to an internal sequence in streptococcal surface protein PAM. *J. Biol. Chem.* **273(38)**: 24420-24424.
- Wilbur W.J., Lipman D.J. (1983)** Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data banks. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **80**: 726-730.
- Wiman B., Lijnen H.R., Collen D. (1979)** On the specific interaction between the lysine-binding sites in plasmin and complementary sites in  $\alpha_2$ -antiplasmin and in fibrinogen. *Biochem. Biophys. Acta* **579**:142-154.
- Wiman B., Collen D. (1978)** On the kinetics of the reaction between human antiplasmin and plasmin. *Eur. J. Biochem.* **84**: 573-578.

- Wiman B., Wallen P. (1973)** Activation of human plasminogen by an insoluble derivative of urokinase. *Eur. J. Biochem.* **36**: 25-31.
- Winkelstein J.A. (1981)** The role of complement in host's defense against *Streptococcus pneumoniae*. *Rev. Infect. Dis.* **3**: 289-298.
- Winram S.B., Lottenberg R. (1998)** Site-directed mutagenesis of streptococcal plasmin receptor protein (Plr) identifies the C-terminal Lys 334 as essential for plasmin binding, but mutation of *plr* gene does not reduce plasmin binding to group A streptococci. *Microbiol.* **144**: 2025-2035.
- Winkelstein J.A., Tomasz A. (1978)** Activation of alternativ complement pathway by pneumococcal cell wall teichoic acid. *J. Immunol.* **120**: 174-178.
- Winkelstein J.A., Tomasz A. (1977)** Activation of alternativ pathway by pneumococcal cell walls. *J. Immunol.* **118**: 151-154.
- Wold F. (1971)** Enolase in: *The Enzymes*, pp. 499-538, Boyer P.D. (ed.), Academic press, New York.
- Wong A.P., Cortez S.L., Baricos W.H. (1992)** Role of plasmin and gelatinase in extracellular matrix degradation by cultured rat mesangial cells. *Am. J. Physiol.* **263**: 1112-1118.
- Wu H.L., Chang B.I., Wu D.H., Chang L.C., Gong C.C., Lou K.L., Shi G.Y. (1990)** Interaction of plasminogen and fibrin in plasminogen activation. *J. Biol. Chem.* **265**: 19658-19664.
- Wu T.P., Padmanabhan K., Tulinsky A. (1994)** The structure of recombinant plasminogen kringle 1 and fibrin binding site. *Blood Coagulation Fibrinolysis* **5**: 157-166.
- Wu T.P., Padmanabhan K., Tulinsky A., Mulichak A. (1991)** The refined structure of the  $\epsilon$ -aminocaproic acid complex of human plasminogen kringle 4. *Biochemistry* **30**: 10589-10594.
- Yother J., McDaniel L., Briles D.E. (1986)** Transformation of encapsulated *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **168**: 1463-1465.



## 7 ANHANG

### **A *Streptococcus pneumoniae*-Stämme**

<b>Stamm - bezeichnung</b>	<b>Quelle</b>	<b>Serotyp</b>	<b>Materialquelle</b>
P 34	ATTC 33400	1	
P 36	NCTC 7978	3	
P 37	NCTC 10319	35A	
P 51	ATCC 11733	2	
P 53	Statens Serum Institut Dänemark	1	
P 54	Statens Serum Institut Dänemark	3	
P 55	Statens Serum Institut Dänemark	4A L	
P 56	Statens Serum Institut Dänemark	6A L	
P 57	Statens Serum Institut Dänemark	6B L	
P 58	Statens Serum Institut Dänemark	8	
P 59	Statens Serum Institut Dänemark	7F	
P 60	Statens Serum Institut Dänemark	9V	
P 61	Statens Serum Institut Dänemark	12F	
P 62	Statens Serum Institut Dänemark	18C	
P 63	Statens Serum Institut Dänemark	19F	
P 64	Statens Serum Institut Dänemark	23F	
P 65	Düsseldorf, 1B	9A	Blutisolat
P 66	Düsseldorf, 2B	11A	Blutisolat
P 67	Düsseldorf, 3B	1	Blutisolat
P 68	Düsseldorf, 4B	4	Blutisolat
P 69	Düsseldorf, 5T	10A	Tracheaisolat
P 70	Düsseldorf, 6B	12F	Blutisolat
P 71	Düsseldorf, 7B	14	Blutisolat
P 72	Düsseldorf, 8B	14	Blutisolat
P 73	Düsseldorf, 9L	1	Liquorisolat
P 74	Düsseldorf, 10B	18B	Blutisolat
P 75	Düsseldorf, 12L	6B	Liquorisolat
P 76	Düsseldorf, 15B	6A	Blutisolat

P 77	Düsseldorf, 19G	ND	Meningitis
P 78	Düsseldorf, 23B	1	Blutisolat
P 79	Düsseldorf, 24B	14	Blutisolat
P 80	Düsseldorf, 25B	14	Blutisolat
P 81	Düsseldorf, 27B	33F	Blutisolat
P 82	Düsseldorf, 28B	18F	Blutisolat
P 83	Düsseldorf, 30B	6A	Blutisolat
P 84	Düsseldorf, 31B	14A	Blutisolat
P 85	Düsseldorf, 33B	3	Blutisolat
P 86	Düsseldorf, 34B	8	Blutisolat
P 87	Düsseldorf, 35B	1	Blutisolat
P 88	Düsseldorf, 36B	7F	Blutisolat
P 89	Düsseldorf, 37B	3	Blutisolat
P 90	Düsseldorf, 38B	1	Blutisolat
P 91	Düsseldorf, 39B	19F	Blutisolat
P 92	Düsseldorf, 40B	18B	Blutisolat
P 93	Düsseldorf, 41B	6B	Blutisolat
P 94	Düsseldorf, 42B	24F	Blutisolat
P 95	Düsseldorf, 43B	3	Blutisolat
P 96	Düsseldorf, 45B	6B	Blutisolat
P 97	Düsseldorf, 46B	4	Blutisolat
P 98	Düsseldorf, 47B	14	Blutisolat
P 99	Düsseldorf, 48B	7F	Blutisolat
P 100	Düsseldorf, 49B	23A	Blutisolat
P 101	Düsseldorf, 50B	1	Blutisolat
P 102	Düsseldorf, 51L	23A	Liquorisolat
P 103	Düsseldorf, 52B	19F	Blutisolat
P 104	Düsseldorf, 53L	14	Liquorisolat
P 105	Düsseldorf, 54B	4	Blutisolat
P 107	Düsseldorf, 29B	18F	Blutisolat
P 108	Düsseldorf, 13B	19F	Liquorisolat
P 109	Düsseldorf, 18L	7F	Blutisolat
P 110	Düsseldorf, 20B	1	Blutisolat

P 111	Düsseldorf, 26B	9V	Blutisolat
P 112	Düsseldorf, 14B	23F	Blutisolat
P 113	Jeffrey Weiser, R6	unbekapselt	
P 114	Jeffrey Weiser, D39	bekapselt	
P 115	R. Hakenbeck, D39	2	
P 116	R. Hakenbeck, R6	unbekapselt	
P 117	Düsseldorf		Nasopharynx- isolat
P 119	P36 Variante aus ZK; A549		
P 120	P36 Variante aus ZK; HEp-2		
P 121	Jeffrey Weiser, P62	9V	klinisches Isolat
P 122	Jeffrey Weiser, P63	9V	klinisches Isolat
P 123	Jeffrey Weiser, P64	9V	klinisches Isolat
P 124	Jeffrey Weiser, P376	6A	klinisches Isolat
P 125	Jeffrey Weiser, P377	6A	klinisches Isolat
P 126	Jeffrey Weiser, P384	6A	klinisches Isolat
P 127	Jeffrey Weiser, P763	6B	klinisches Isolat
P 128	Jeffrey Weiser, P765	6B	klinisches Isolat
P 129	E.I.Tuomanen		
P 131	VU?		Pharynxisolat
P 137	VE?		Augenisolat
P 139	E.I.Tuomanen	R6x	Kapsel-negativ
P 197	Darwin, NT, Australien		
P 198	Darwin, NT, Australien	6B	
P 199	Darwin, NT, Australien		
P 200	Darwin, NT, Australien	23F	
P 201	Darwin, NT, Australien		
P 202	Darwin, NT, Australien	6B	
P 203	Darwin, NT, Australien	19A	
P 204	Darwin, NT, Australien	35B	
P 205	Darwin, NT, Australien	9N	
P 206	Darwin, NT, Australien	10A	
P 207	Darwin, NT, Australien	23F	

P 208	Darwin, NT, Australien	23F	
P 209	Darwin, NT, Australien	19F	
P 210	Darwin, NT, Australien	9W	
P 211	Darwin, NT, Australien	14	
P 212	Darwin, NT, Australien	19F	
P 213	Darwin, NT, Australien		
P 214	Darwin, NT, Australien		
P 215	Darwin, NT, Australien		
P 216	Darwin, NT, Australien	6B	

**Tabelle 13:**

Auflistung sämtlicher in dieser Arbeit verwendeter Stämme von *Streptococcus pneumoniae*

Für alle *Streptococcus pneumoniae*-Stämme ist die laufende Stammnummer der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Mikrobielle Pathogenität der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung sowie eine Typenbezeichnung angegeben. Die definierten Stämme wurden kommerziell von den Stammsammlungen „National Collection of Type Cultures (NCTC)“ und „American Type Culture Collection (ATCC)“ erworben. Die IgA-Protease-Mutante (P 114) wurde von J. Weiser, University of Pennsylvania, Philadelphia, D39 (Avery et al., 1944) und R6 (Tiraby et al., 1975) von R. Hakenbeck, Universität Kaiserslautern, R6x (Tiraby und Fox, 1973) von E. I. Tuomanen, Rockefeller University, New York zur Verfügung gestellt. Die klinischen Isolate stammen von G. Zysk aus der Abteilung Medizinische Mikrobiologie der Universität Düsseldorf oder vom Statens Serum Institut in Kopenhagen, Dänemark. Sofern eine Serotypisierung erfolgte, ist der entsprechende Kapselserotyp angegeben.

**B Herstellernachweis der Laborgeräte**

Agarosegel-Elektrophoresekammer (Horizon® 58, H5 und 11.14)

Gibco

Autoklav (Tecnoklav 50)

Tecnomara

BIACORE 2000

Biacore

Brutschrank (37°C; 28°C)

Heraeus

CO <sub>2</sub> -Inkubator (5% CO <sub>2</sub> ), Typ B5042	Heraeus
Econo-Column Pump	Bio-Rad
Mit Photometer 2238 Unicord SII	Pharmacia
Mit Schreiber 2210 Recorder 2-Channel	Pharmacia
Elektroporationsgerät	Bio-Rad
Elektroporationsküvetten (0,2 cm Elektrodenabstand)	Bio-Rad
ELISA-Reader, Titertek Fluoroscan II	Bio-Rad
Feinwaage Sartorius MC1 Research RC2505	BLB
FPLC-System	Pharmacia
French <sup>®</sup> Pressure Cell	SLM Instruments
Gamma( $\gamma$ )-Counter (Cobra <sup>™</sup> II Auto-Gamma)	Packard
Gel Air Drying System	Bio-Rad
Heizblock (Thermomixer 5436)	Eppendorf
Hybridisierungssofen	Biometra
Inkubationsschüttler	HAT
Magnetrührer heizbar, RCT basic	KIKA
Magnetrührer M20/1	Franco <sup>®</sup>
PCR-Thermocycler	
pH-Meter CG 804	Schott
Photometer (4054 UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec Plus)	Pharmacia
Power Supply 200/2.0 und Power Pac 300	Bio-Rad
SDS-Gelkammer	Bio-Rad
Semi-Dry-Trans-Blot <sup>®</sup> SD (Transfer Cell)	Bio-Rad
Steril-Werkbank Lamin Air <sup>®</sup> HLB 2427	Heraus
Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultra-Zentrifuge Sorvall	DuPont
Ultraschallgerät Labsonic U	B. Braun
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Video-Dokumentation (Midi-Doku <sup>™</sup> )	Herolab
Vortex Genie 2	Hobein AG
Waage 2200S	Sartorius
Wasserheizbad	GFL <sup>®</sup>
Zentrifugen	
Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	DuPont
Omnifuge 2.0RS	Heraus
Biofuge 13	Heraus
Zentrifuge 5415 C und 5417 R	Eppendorf

## C Verbrauchsmaterial

Centriprep-3 Concentrators	amicon
Dialyseschlauch(16 mm, MWC 12.000-14.000)	Bio-Rad
Falcon-Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Sarstedt
Hyperfilm™ ECL™ (high performance chemiluminescence film)	Amersham
Injektionskanüle 0,9 x 40 mm	Enosa
Kurzpipette, 5 ml und 10 ml (steril, Plastik)	Sterilin
Mikrotiterplatten, Maxisorp F96	Nunc
Nitrocellulose-Membran	Bio-Rad
Nylonmembran, (PVDF, Immobilon™)	Millipore
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner
Petrischalen für Bakterienkultur, 10 mm und 28 mm	Greiner
Platikküvetten ,1 ml	Greiner
Plastikpipette, 1 ml	Greiner
Reaktionsgefäße, 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Röntgenfilme	Kodak
Skalpellklingen, spitz	Bahia
Slide-A-Lyzer® Cassette(10000MWCO)	Pierce
Steril-Filter (0,2 µM)	Sartorius
Vinyl-Handschuhe	Meditrade
Whatman-Filterpapier	Bio-Rad
Zentrifugenröhrchen, 12 ml	Greiner

## D Chemikalien

<b>Aceton</b> z.A. (~ 99,5%)	Merck
Acrylamid-N,N'-Methylen-Bisacrylamid	Bio-Rad
Adenin	Sigma
Agar agar	Difco
Agarose	Gibco
Ampicillin	Sigma
Aprotinin	Sigma
APS	Sigma
<b>Bacto-</b> Agar	Difco

Bacto Trypton	Difco
Bromphenolblau	Serva
BSA	Sigma
<b>CaCl<sub>2</sub></b> -Dihydrat z.A. (~99,5%)	Merck
CHAPS	ESA
4-Chloro-1-naphtol	Fluka
Chloroform	Baker
Coomassie Brilliant Blue®	Bio-Rad
CSPD	Roche
<b>D</b> -+-Glucose	Sigma
DEPC	
Digoxigenin Oligonukleotide 3'-End Labeling Kit	Roche
DMF	Merck
DNase I	Roche
<b>EDC</b>	Fluka
EDTA	Baker
Eisessig	Baker
Erythromycin	Sigma
Elastin	Sigma
Ethanol z.A. (~99,8%)	Merck
Ethanol (vergällt)	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
<b>FCS</b> (Fetal Calf Serum )	Sigma
Formaldehyd (37%)	Merck
Formamid	Merck
<b>Glutaraldehyd</b>	Merck
Glycerin z.A. (~ 87%)	Merck
Glycin	Merck
<b>Harnstoff</b>	Riedel-de-Häen
HCl	Baker
Hefeextrakt	Difco
Hering Sperm DNA	Gibco
Imidazol	Merck
IPTG	Sigma
<sup>125</sup> Iod	Amersham
Isopropanol	Baker
<b>Kanamycin</b>	Serva

KCl	Merck
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Sigma
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Sigma
Kollagen, Typ IV, VI, IX	Sigma
LiCl	Sigma
Lysozym	Sigma
<b>M</b> agermilch (0,3% Fettanteil)	Haushaltsware
$\text{MgCl}_2$ - Hexahydrat	Merck
$\text{MgSO}_4$	Merck
Maleinsäure	Sigma
2- Mercaptoethanol	Serva
Methanol	Baker
MOPS	
Mutanolysin	Sigma
<b>N</b> atriumacetat	Merck
Natriumcitrat	Merck
NaCl z.A.	Merck
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ z.A. (wasserfrei)	Merck
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Baker
NaOH	Sigma
$\text{NH}_4$ -Acetat	Riedel-de-Haën
N-Hydroxysuccinimid	Fluka
NADH-Disodiumsalz	Sigma
N-Laurylsarcosin	Sigma
Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roche
NZ-Amine (Casein Hydrolysat)	Otto Aldaf
<b>P</b> henol	Roth
Phenol/Chloroform (jeweils 50%)	Roth
pH-Meter Kalibrier-Lösungen (pH 4,0; 7,0;10,0)	Sigma
2-Phosphoglycerinsäure	Sigma
Phosphoenolpyruvat	Sigma
Plasminogen	Sigma
Plasmin	Sigma
Plasminogen Lysine-bindingsites 1-3	Sigma
PMSF	Sigma
Polyethylenglykol (8000)	Merck
Polyvinylpyrrolidon	Sigma



<b>QIAGEN Purifikation Kits</b>	Qiagen
QIAGEN genomic DNA Kit	
QIAGEN Plasmid Midi Kit	
QIAprep Spin Plasmid Kit	
QIAquick Gel Extraction Kit	
QIAquick Nukleotide Removal Kit	
QIAquick PCR-Purifikation Kit	
<b>RNeasy® Midi Kit</b>	
RNAse	Applichem
<b>Salzsäure (siehe HCl)</b>	Baker
SDS	Fluka
<b>TCA</b>	Merck
Temed	Bio-Rad
Tetracyclin	Serva
TRIZMA-Base	Sigma
Trockenmilchpulver (0,3% Fettanteil)	Glücksklee
Trypanblau (Standard)	Fluka
Trypsin-Inhibitor	Merck
Tween® 20	Merck
Wasserstoffperoxyd	Merck
<b>X-Gal</b>	Roth

## E Firmennachweis

Amersham	Life Science, Braunschweig, Deutschland
BioMérieux	l'Etoile, Frankreich
BioRad	München, Deutschland
Dianova	Hamburg, Deutschland
Difco Laboratories	Detroit, USA
Eurogentech	Seraing, Belgien
GibcoBRL	Effenstein, Deutschland
Greiner	Nürtingen, Deutschland
J.T. Baker	Deventer, Niederlande
Pharmacia	siehe Amersham
QIAGEN	Hilden, Deutschland
Pierce	Rockford, USA
Promga	Mannheim, Deutschland

Riedel-de-Häen	Seelze, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Sarstedt	Hildesheim, Deutschland
Schleicher und Schuell	Dassel, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
Sigma	München, Deutschland
Stratagene	Heidelberg, Deutschland

## F Längenstandards für DNA und Proteine

### DNA-Längenstandard

$\lambda$ HindIII- Marker von New England Biolabs:

23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2027 bp, 564 bp

DIG- $\lambda$ HindIII- Marker von Roche:

23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2027 bp, 564 bp

1 KB-Ladder von Gibco BRL:

12216 bp, 11198 bp, 10180 bp, 9162 bp, 8144 bp, 7126 bp, 6108 bp, 5090 bp, 4072 bp, 3054 bp, 2036 bp, 1636 bp, 1018 bp, 507 bp, 396 bp, 344 bp, 298 bp, 220 bp, 201 bp, 154 bp, 134 bp, 75 bp

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus von MBI Fermentas:

3000 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1200 bp, 1031 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp

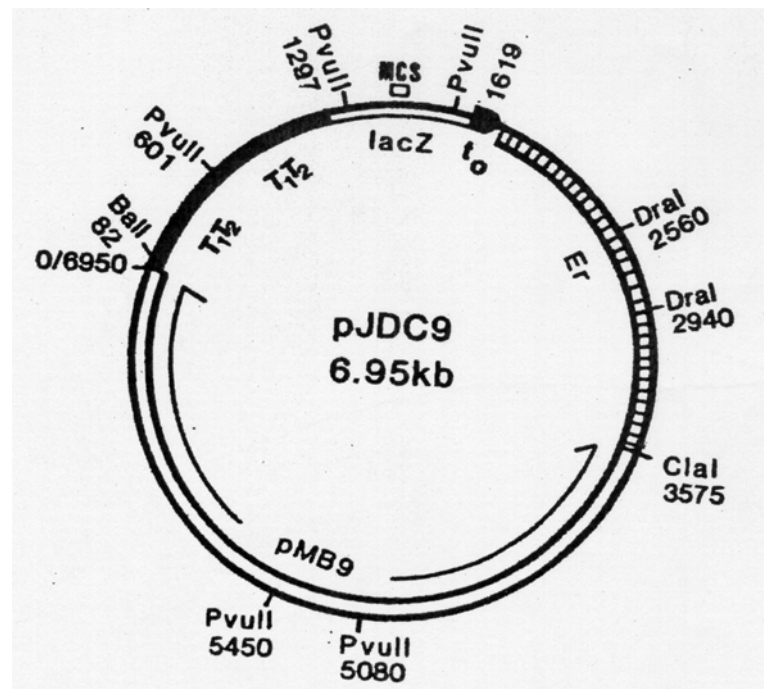
Smart Ladder von Eurogentech:

10000 bp (100 ng), 8000 bp (80 ng), 6000 bp (60 ng), 5000 bp (50 ng), 4000 bp (40 ng), 3000 bp (30 ng), 2500 bp (25 ng), 2000 bp (20 ng), 1500 bp (15 ng), 1000 bp (10 ng), 800 bp (80 ng), 600 bp (60 ng), 400 bp (40 ng), 200 bp (20 ng)

### Protein-Marker (MBI/Fermentas):

135 kDa; 97 kDa; 78 kDa; 57,5 kDa; 38,5 kDa; 33,5 kDa

## G Vektorkarte von pJDC9



## H Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cpm	counts per minute
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetan – 3,2-(5'chloro) tricyclo [3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ] decan} –4yl) phenylphosphat
C	Cytosin
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DMF	N,N'-Dimethylformamid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser

dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
EDC	N-(3-Dimethyl(aminopropyl)-N-ethyl-carbodiimid Hydrochlorid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ery <sup>R</sup>	Erythromycin-Resistenz
EtBr	Ethidiumbromid
F	Farad
g	Gramm
G	Guanin
GST	Gluthation-S-transferase
h	Stunde
His-tag	6 Histidin-Aminosäuren
<sup>125</sup> Iod	Iod-isotop 125
IgG	Immunglobulin G
IgA	Immunglobulin A
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KFE	Kolonieformierende Einheiten
Konz.	Konzentration
l	Liter
Lsg.	Lösung
M	molar (mol/l)
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molekulargewichts-Cut-Off
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
NaAc	Natriumacetat
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-tri-Essigsäure (nitrilo-tri-acetic-acid)
nm	Nanometer
NiNTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
OD	Optische Dichte
Ω	Ohm (Einheit des elektrischen Widerstandes)
ORF	Offenes Leseraster (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Piko-Mol
PVDF	Poly-Vinyliden-Di-Fluorid

RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
S-2251	D-Valyl-Leucyl-Lysyl-p-DiNitroanilide
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	Oberflächen-Plasmon-Resonanz (surface plasmon resonance)
T	Thymin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet <sup>R</sup>	Tetrazyklin-Resistenz
TIGR	The Institute of Genomic Research
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris- (hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
U	Unit (Enzymeinheit)
ü/N	über Nacht
(v/v)	Volumenprozent
V	Volt (Einheit der Spannung)
Vol	Volumen
(w/v)	Gewichtsanteil
(w/w)	Gewichtsprozent
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranosid

## I Buchstabencode der Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Bereich Mikrobiologie der GBF unter Leitung von Prof. Dr. K. N. Timmis in der Abteilung Mikrobielle Pathogenität durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Timmis für die Möglichkeit, die Doktorarbeit anfertigen zu können und für die Übernahme des Referats.

Prof. Dr. G. S. Chhatwal gilt mein Dank für die Unterstützung und für die Schaffung der geeigneten Rahmenbedingungen zur Durchführung der Arbeit.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. Sven Hammerschmidt für die Bereitstellung des Themas und für die kritische Durchsicht des Manuskriptes danken und ebenso für die Ermöglichung meines Auslandsaufenthaltes.

Ich bedanke mich sehr für das Vermitteln konstruktiver Kooperationen innerhalb und außerhalb der GBF und für die Förderung einer kontinuierlichen Teilnahme an interessanten Fachtagungen und Kongressen. Vielen Dank für die interessierte, begeisterte und motivierende Begleitung der Arbeit während der vergangenen drei Jahre. Oftmals wurden in konstruktiven Diskussionen neue gedankliche Türen geöffnet und die gezielte, systematische Umsetzung eigener Ideen gefördert. Dies trug maßgeblich dazu bei, daß der Wissensdurst und die Faszination niemals erloschen.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch Melanie Tillig, die mir während eines großen Teils der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand und Astrid Müller für die wertvollen methodischen Tips und die Unterstützung im letzten Jahr der Arbeit.

Ich bedanke mich sehr bei Christine Elm für die "kreative" Zusammenarbeit im Labor und für die Durchsicht des Manuskriptes.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei den Mitgliedern der Pneumokokken-Arbeitsgruppe mit Dagmar Bracht, Sieglinde Keilholz-Gast, Daniela Pracht, Marleen Seiler, Antonia Toppel und Daniela Wild, die durch die Wahrung eines freundschaftlichen, hilfsbereiten, und oft sehr lustigen Miteinanders ein tolles Arbeitsklima schufen und die Durchführung der Arbeit dadurch sehr erleichterten. Ich danke ebenso den Mitgliedern der Abteilung Mikrobielle Pathogenität und ganz besonders Katja Mummenbrauer für die Unterstützung in organisatorischen Belangen.

Ein sehr großer Dank gilt Dr. Manfred Rohde und Ellruth Müller für die schnelle Erstellung der wichtigen elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Dr. Ronald Frank, Dr. Werner Tegge und den Mitarbeiter/innen der Arbeitsgruppe Strukturforschung der GBF danke ich sehr für die Herstellung der Spot-Membranen und der synthetischen Peptide.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Oliver Diekmann für die fundierte Einführung in die Oberflächenresonanztechnik.

Bei Frau Getzlaff und Frau Krüger bedanke ich mich für die Sequenzierungen auf Protein- bzw. DNA-Ebene.

Stefanie Ehinger aus der Abteilung Strukturbiologie unter der Leitung von Dr. D. Heinz danke ich für die Überlassung der Proteinstrukturabbildungen.

Ich danke den Mitgliedern von "Ballou" für die freundschaftliche Begleitung und den wichtigen musikalischen Ausgleich.

Ganz besonders danke ich meinem Vater für die Unterstützung und für das Verständnis.

